



TESIS - RE142541

**PROSES FERMENTASI ECENG GONDOK OLEH  
*Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces  
cerevisiae* DENGAN METODE *SEPARATE  
HYDROLYSIS AND FERMENTATION* (SHF)**

NADIA AMANAH  
3313201 012

DOSEN PEMBIMBING  
Dr. Ir. ELLINA SITEPU PANDEBESIE, MT

DOSEN CO-PEMBIMBING  
Ir. SRI PINGIT WULANDARI, M.Si

PROGRAM MAGISTER  
JURUSAN TEKNIK LINGKUNGAN  
FAKULTAS TEKNIK SIPIL DAN PERENCANAAN  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2015



TESIS - RE142541

**FERMENTATION PROCESS OF WATER HYACINTH  
BY *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces  
cerevisiae* USING SEPARATE HYDROLYSIS AND  
FERMENTATION METHOD (SHF)**

NADIA AMANAH  
3313201 012

SUPERVISOR  
Dr. Ir. ELLINA SITEPU PANDEBESIE, MT

CO SUPERVISER  
Ir. SRI PINGIT WULANDARI, M.Si

MASTER PROGRAM  
ENVIRONMENTAL ENGINEERING DEPARTMENT  
FACULTY OF CIVIL ENGINEERING AND PLANNING  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2015

**Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar  
Magister Teknik (MT)  
di  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
oleh :**

**Nadia Amanah  
Nrp. 3313 201 012  
Tanggal Ujian : 9 Januari 2015  
Periode Wisuda : Maret 2015**

**Disetujui Oleh :**

**1. Dr. Ir. Ellina Sitepu Pandebesie, MT  
NIP: 19560204 199203 2 001**

**(Pembimbing I)**

**2. Ir. Sri Pingit Wulandari, M.Si  
NIP: 19620603 198701 2 001**

**(Pembimbing II)**

**3. Prof. Dr. Yulinah Trihadiningrum, M.AppSc  
NIP: 19530706 198403 2 004**

**(Penguji)**

**4. IDAA Warmadewanthi, ST, MT, PhD  
NIP: 19750212 1999903 2 001**

**(Penguji)**

**5. Arseto Yekti Bagastyo, ST, MT, M.Phil, PhD  
NIP: 19820804 200501 1 001**

**(Penguji)**



**Direktur Program Pascasarjana,**

**Prof. Dr. Ir. Adi Soeprijanto, MT  
NIP: 196404051990021001**

**PROSES FERMENTASI ECENG GONDOK OLEH *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* DENGAN METODE  
SEPARATE HYDROLYSIS and FERMENTATION (SHF)**

Nama Mahasiswa : Nadia Amanah  
NRP : 3313 201 012  
Pembimbing : Dr. Ir. Ellina Sitepu Pandebesie, MT  
Co-Pembimbing : Ir. Sri Pingit Wulandari, M.Si

**ABSTRAK**

Eceng gondok merupakan tanaman air yang mengapung di atas perairan. Pertumbuhannya yang relatif cepat dapat menimbulkan eutrofikasi pada perairan sehingga digolongkan sebagai gulma. Fementasi merupakan salah satu teknologi pengolahan limbah eceng gondok yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui mikroorganisme dan penambahan inokulum untuk mendapatkan etanol pada kondisi optimum.

Metode fermentasi dilakukan dengan metode *separate hydrolysis and fermentation* (SHF). Metode ini meliputi tahap *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi secara terpisah. Tahap *pretreatment* selama 10 hari menggunakan jamur *P. chrysosporium* dilanjutkan pemanasan. Tahap hidrolisis dilakukan dengan menambahkan jamur *T. viride* dan *A. niger* 1 mL setiap 1 gram substrat, waktu inkubasi selama 72 jam. Tahap fermentasi dengan menambahkan *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dengan konsentrasi inokulum 5% (v/v) dan 10% (v/v) pada masing-masing reaktor. Waktu fermentasi selama 72 jam dengan pengambilan sampel pada jam ke 48 dan ke 72. Analisis data menggunakan metode *respon surface*.

Analisis kadar etanol menggunakan *Gas Chromatography* (GC) Hewlett Packard (HP-series 6890). Kadar etanol tertinggi dari sampel yang telah dianalisis diperoleh kadar etanol tertinggi adalah 1,195 mg/g dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae* 10% (v/v) pada media 10 gram eceng dan waktu fermentasi selama 48 jam.

**Kata kunci :** *Eceng gondok, fermentasi, S. cerevisiae, Z. mobilis*

***FERMENTATION PROCESS OF WATER HYACINTH BY  
Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae USING  
SEPARATE HYDROLYSIS AND FERMENTATION METHOD  
(SHF)***

**ABSTRACT**

*Water hyacinth is water plant on the water. It can grow rapidly on the water, subsequently it creates eutrophication. Moreover, the increasing of Water Hyacinth can increase solid waste generation. However, it can be solved by fermentation to reduce water hyacinth water generation. Fermentation is one of water hyacinth waste treatment which converts water hyacinth to be bioethanol. Therefore, this study focused to find optimum of microorganism and inoculum variation condition in fermentation.*

*Separate hydrolysis and fermentation (SHF) was used to achieve the goals. This method was done by three steps such as pretreatment, hydrolysis, and fermentation. Pretreatment was done in 10 days by using *P. chrysosporium* and follow heating processed. Then, hydrolysis stage done by using *T. viride* and *A. niger*. *T. viride* and *A. niger* were added in 1 mL for 1 g substrate, then it incubation for 72 hours. In fermentation stage, *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* were added with 5% inoculum and 10% inoculum respectively. Fermentation was done in 72 hours and sample collection was done on 48 and 72 hours. Then data were analyzed using response surface method.*

*Moreover, ethanol content was analyzed using Gas Chromatography (GC) Hewlett Packard (HP-series 6890). Finally, the highest ethanol concentration in optimum condition is 1,195 mg/g were added *S. cerevisiae* 10% in 10 g substrate and fermentation time 48 hours.*

**Keyword:** *Fermentation, S. cerevisiae, Z. mobilis, Water Hyacinth*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya serta kekuatan untuk bergerak dan berfikir sehingga penyusunan tesis ini dapat diselesaikan. Selesaiannya laporan tesis ini semoga dapat dijadikan sebagai syarat menyelesaikan jenjang strata dua (S2) di Jurusan Teknik Lingkungan FTSP ITS Surabaya. Penulisan laporan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak dan bimbingan dan bantuan yang diberikan, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Ellina S. Pandebesie, MT, selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, penjelasan, dan saran.
2. Ibu Ir. Sri Pingit Wulandari, M.Si, selaku co-pembimbing yang telah memberikan bimbingan.
3. Bapak Ir. Eddy S. Soedjono, Dipl., SE., MSc., Ph.D, selaku Ketua Jurusan Program Studi Teknik Lingkungan.
4. Ibu Ipung Fitri Purwanti, ST, MT, Ph.D, selaku Koordinator Tesis.
5. Bapak Dr. Ali Masduqi, MT, selaku dosen wali yang telah membantu selama konsultasi perkuliahan.
6. Ibu Prof. Dr. Yulinah Trihadiningrum, M.AppSc, Ibu IDAA Warmadewanthi, ST, MT, Ph.D, Bapak Arseto Yekti Bagastyo, ST, M.Phil, Ph.D sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dalam penyusunan tesis..
7. Mama dan Abah tercinta yang selalu mendoakan, memberikan nasihat, dan menyemangati setiap waktu serta adinda M. Rif'a Rahman, keluargaku pendiri Al-baity Al-Jannaty.
8. Sahabat-sahabat seperantauan yang memberikan semangat, keceriaan, bantuan dan kebersamaan. Kawan satu kampung, Teruntuk Winda kawan seperjuangan tesis dan teruntuk Gina yang selalu membantu kami.
9. Mas Vebi dan Mas Raynard yang dengan sabar membimbing serta mengarahkan dan mengajarkan metode penelitian.

10. Mbak Merry, mbak I'in, Pak Hadi, Pak Anshari, Pak Edi sebagai laboran di Laboratorium Teknik Lingkungan ITS yang telah banyak membantu dalam kegiatan penelitian.
11. Teman-teman kelas Mata Kuliah Sampah yang sudah banyak mensupport dan membawa banyak pengalaman baru.
12. Teman-teman satu laboratorium yang selama ini sudah bekerja sama selama penelitian untuk saling membantu.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan laporan tesis ini.

Besar harapan penulis untuk saran dan kritik bagi pembaca terhadap segala kekurangan dalam penyusunan laporan tesis ini. Akhir kata penulis berharap laporan tesis ini dapat dijalankan dengan baik serta bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, Januari 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

Lembar Pengesahan .....	i
Abstrak .....	iii
<i>Abstrack</i> .....	iv
Kata Pengantar.....	v
Daftar Isi.....	vii
Daftar Gambar .....	ix
Daftar Tabel.....	x
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	3
1.5. Ruang Lingkup Penelitian .....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Eceng Gondok di Perairan.....	5
2.2 Kandungan Lignoselulosa .....	6
2.3 <i>Pretreatment</i> dan Manfaatnya Pada Fermentasi.....	9
2.4 Proses Hidrolisis .....	10
2.5 Proses Fermentasi Etanol .....	12
2.6 Pemanfaatan Etanol .....	14
2.7 Metode <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i> (SHF) .....	15
2.8 Mikroorganisme Pengkonversi Gula Reduksi.....	16
2.9 Pengukuran Kadar Etanol.....	19
2.10 Percobaan Faktorial $2^k$ .....	19
BAB 3 METODE PENELITIAN .....	21
3.1 Ide Penelitian .....	21
3.2 Rumusan Masalah .....	23
3.3 Studi Pustaka.....	23
3.4 Tahap Persiapan .....	23



3.5 Tahap <i>Pretreatment</i> .....	24
3.6 Tahap Hidrolisis .....	25
3.7 Tahap Fermentasi dan Perlakuan Variabel .....	25
3.8 Pengukuran Kandungan Sampel .....	27
3.9 Hasil dan Pembahasan .....	28
3.10 Kesimpulan dan Saran .....	29
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	31
4.1 Preparasi Eceng Gondok .....	31
4.2 Karakterisasi Substrat Eceng Gondok .....	31
4.3 <i>Pretreatment</i> Substrat Eceng Gondok Menggunakan <i>P. chrysosporium</i> dan Hidrolisis Menggunakan <i>T. viride</i> dan <i>A. niger</i> .....	34
4.4 Kadar Gula Reduksi Pada Tahap Hidrolisis .....	38
4.5 Proses Fermentasi Menggunakan <i>S. cerevisiae strain 08BET</i> dan <i>Z. mobilis strain 08BET</i> .....	40
4.6 Analisis Menggunakan Metode <i>Respon Surface</i> (Minitab 16) .....	48
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....	51
5.1 Kesimpulan .....	51
5.2 Saran .....	51
DAFTAR PUSTAKA .....	53
LAMPIRAN 1 .....	59
LAMPIRAN 2 .....	68
LAMPIRAN 3 .....	72
LAMPIRAN 4 .....	82
LAMPIRAN 5 .....	86

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Lignoselulosa Pada Jenis Kayu .....	6
Tabel 3.1 Data Kadar Etanol Proses Fermentasi Metode SHF .....	27
Tabel 4.1 Komponen C, N, P dalam Substrat Eceng Gondok .....	32
Tabel 4.2 Kadar Awal Lignoselulosa Setelah Tahap Hidrolisis.....	36
Tabel 4.3 Kadar Gula Reduksi Setelah Proses Hidrolisis .....	38
Tabel 4.4 Kadar Lignoselulosa Setelah Proses Fermentasi 72 jam.....	40
Tabel 4.5 Kadar Gula Reduksi Setelah Proses Fermentasi .....	42
Tabel 4.6 Kadar Etanol Setelah Proses Fermentasi .....	44

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Selulosa.....	7
Gambar 2.2 Skema Pembentukan Etanol.....	8
Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan <i>P. chrysosporium</i> .....	10
Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan (a) <i>T. viride</i> , dan (b) <i>A. niger</i> .....	11
Gambar 2.5 Reaksi Senyawa Pada Proses Fermentasi .....	14
Gambar 2.6 Tahapan Produksi Etanol Menggunakan Metode SHF.....	16
Gambar 2.7 Kurva Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> .....	17
Gambar 2.8 Kurva Pertumbuhan <i>Z. mobilis</i> .....	19
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian .....	22

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Eceng gondok tumbuh subur pada perairan yang dangkal terutama yang mengandung lumpur. Kandungan nutrisi yang terdapat pada perairan mudah diserap oleh eceng gondok. Pengaruh eceng gondok terhadap perairan diantaranya adalah menghambat lancarnya arus air, mempercepat proses pendangkalan karena memiliki kemampuan untuk menahan partikel-partikel yang terdapat dalam air (Astuti, 2013). Perkembangbiakan eceng gondok yang begitu cepat dapat menyebabkan eutrofikasi pada perairan. Eutrofikasi dapat menyebabkan tertutupnya muka perairan (Soeprbowati, 2012). Kondisi ini membuat eceng gondok digolongkan sebagai gulma perairan (Yonathan dkk., 2013).

Eceng gondok yang merupakan gulma pada perairan harus dikelola dengan benar sehingga tidak menimbulkan permasalahan baru. Saat ini eceng gondok banyak dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan biogas, kompos, briket, kertas, bahan organik alternatif, dan sebagai bahan pembuatan bioetanol (Sittadewi, 2007; Merina dan Trihadiningrum, 2011; Rafsanjani dkk., 2012; Yonathan dkk, 2013). Potensi eceng gondok sebagai bahan pembuatan bioetanol cukup besar dikembangkan untuk mengatasi timbulan limbah eceng gondok (Rafsanjani dkk., 2012).

Pertumbuhan eceng gondok yang cepat, kandungan selulosa dan hemiselulosa didalamnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol (Ma dkk., 2010; Axelsson, 2011). Kandungan selulosa dan senyawa organik pada eceng gondok berpotensi memberikan nilai kalor yang cukup baik. Salah satu metode pembuatan bioetanol adalah dengan fermentasi menggunakan jamur dan bakteri selulolitik. Proses fermentasi pada umumnya dilakukan dengan proses *batch* yang banyak diaplikasikan di dunia industri, karena menghasilkan kadar etanol yang tinggi (Axelsson, 2011).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Kusumaningati (2013), fermentasi menggunakan *Z. mobilis* telah menghasilkan kadar etanol sebesar 9,5% dengan konsentrasi *inokulum* 10% selama 6 hari. Menurut Muslihah (2011), kadar optimum etanol sebesar 11,64% (v/v) dengan konsentrasi *inokulum* *Z. mobilis* 5% selama 6 hari. *Z. mobilis* ini memiliki karakteristik sebagai bakteri Gram negatif, anaerob tetapi toleran terhadap oksigen atau biasa disebut anaerob fakultatif. *Z. mobilis* dapat memfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa menghasilkan sejumlah etanol dan CO<sub>2</sub>, tetapi tidak dapat memfermentasikan manitol dan laktosa, namun mampu menghasilkan enzim katalase. Kelemahannya tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon serta tidak memiliki enzim *triptofanase* dan gelatinas. Selain *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* juga mampu menghasilkan etanol dari reduksi hati nanas sebesar 30,30% Wignyanto (2001). Penelitian lain menyatakan hasil optimum 1,5% kadar etanol dari eceng gondok dengan waktu fermentasi 3 hari menggunakan *S. cerevisiae* (Esthiaghi dkk., 2012).

Produksi bioetanol dari bahan lignoselulosa bergantung pada teknologi yang akan digunakan. Pada penelitian sebelumnya diketahui kadar gula reduksi optimum diperoleh dengan proses *pretreatment* menggunakan *Phanerochaete chrysosporium* dan penambahan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%. Tahap hidrolisis menggunakan *T. viride* dan *A. niger* dengan jumlah kadar gula reduksi 31,694 mg/g (Novembrianto, 2014). Proses ini dilakukan untuk mereduksi selulosa dan hemiselulosa menjadi kadar gula yang akan dikonversi menjadi etanol.

Penelitian dengan metode SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) diketahui memiliki hasil fermentasi yang efisien (Ma dkk., 2010; Gupta, 2009). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian fermentasi eceng gondok menggunakan proses *pretreatment* *P. chrysosporium*, hidrolisis menggunakan *T. viride* dan *A. niger* digunakan metode SHF menggunakan mikroorganisme *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Manakah mikroorganisme yang menghasilkan kadar etanol optimum dalam proses fermentasi eceng gondok menggunakan metode SHF?

2. Berapakah konsentrasi mikroorganisme optimum dalam pembentukan etanol pada proses fermentasi eceng gondok menggunakan metode SHF?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan mikroorganisme yang menghasilkan kadar etanol optimum dalam proses fermentasi eceng gondok menggunakan metode SHF.
2. Menentukan konsentrasi mikroorganisme optimum dalam pembentukan etanol pada proses fermentasi eceng gondok menggunakan metode SHF.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini bermanfaat sebagai salah satu metode konservasi lingkungan perairan yang ditumbuhi oleh eceng gondok secara berlebihan.

### **1.5 Ruang Lingkup Penelitian**

1. Penelitian dilakukan pada skala laboratorium
2. Biakan *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga, Surabaya.
3. Eceng gondok yang digunakan adalah eceng gondok yang berasal dari sungai dan drainase di sekitar wilayah ITS.

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Eceng Gondok di Perairan**

Eceng gondok termasuk famili *Pontederiaceae*. Tanaman ini hidup di daerah tropis maupun subtropis. Eceng gondok digolongkan sebagai gulma perairan yang mampu menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan dan berkembang biak secara cepat. Tempat tumbuh yang ideal bagi tanaman eceng gondok adalah perairan yang dangkal dan berair keruh, dengan suhu berkisar antara 28-30° C dan kondisi pH berkisar 4-12. Pada perairan yang dalam dan berair jernih di dataran tinggi, tanaman ini sulit tumbuh. Eceng gondok mampu menghisap air dan menguapkannya ke udara melalui proses evaporasi. Bunga eceng gondok berwarna ungu muda (lila) dan banyak dimanfaatkan sebagai bunga potong (Gerbano dan Siregar, 2005).

Eceng gondok memiliki keunggulan dalam kegiatan fotosintesis, penyediaan oksigen dan penyerapan sinar matahari. Bagian dinding permukaan akar, batang dan daunnya memiliki lapisan yang sangat peka sehingga pada kedalaman yang ekstrem sampai 8 meter di bawah permukaan air masih mampu menyerap sinar matahari serta zat-zat yang larut di bawah permukaan air. Akar, batang, dan daunnya juga memiliki kantung-kantung udara sehingga mampu mengapung di air. Keunggulan lain dari eceng gondok adalah dapat menyerap senyawa nitrogen dan fosfor dari air yang tercemar, berpotensi untuk digunakan sebagai komponen utama pembersih air limbah dari berbagai industri dan rumah tangga (Ratnani dkk., 2011).

Sebagai salah satu tanaman dengan laju pertumbuhan tercepat, eceng gondok memproduksi terutama melalui stolon yang membentuk anak tanaman. Eceng gondok juga dapat menghasilkan tanaman baru melalui fragmentasi (pecah menjadi bagian kecil), membentuk tunas daun di pucuk dasar batang, dan memproduksi sejumlah besar bibit yang tahan hingga tiga puluh tahun. Eceng



gondok umum (*Eichhornia crassipes*) tumbuh secara agresif, dan diketahui dapat melipat-gandakan populasinya dalam dua minggu (Flacker, 2004).

## 2.2 Kandungan Lignoselulosa

Material berbasis lignoselulosa (*lignocellulosic material*) memiliki substrat yang cukup kompleks karena didalamnya terkandung lignin, polisakarida, zat ekstraktif, dan senyawa organik lainnya. Bagian terpenting dan yang terbanyak dalam material lignoselulosa adalah polisakarida khususnya selulosa yang terbungkus oleh lignin dengan ikatan yang cukup kuat. Dalam kaitan konversi biomassa, bagian yang terpenting adalah polisakarida. Karena polisakarida tersebut yang akan dihidrolisis menjadi monosakarida seperti glukosa, sukrosa, xilosa, arabinosa dan lain-lain sebelum dikonversi menjadi etanol (Samsuri dkk., 2007). Berikut disajikan kandungan lignoselulosa pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan Lignoselulosa Pada Jenis Kayu

Unsur pokok	Kayu keras (%)	Kayu halus/lunak (%)
Selulosa	50-50	40-50
Hemiselulosa	25-35	25-30
Lignin	20-25	25-35
Pektin	1 - 2	1 - 2

Sumber: Joshi dkk., (2011).

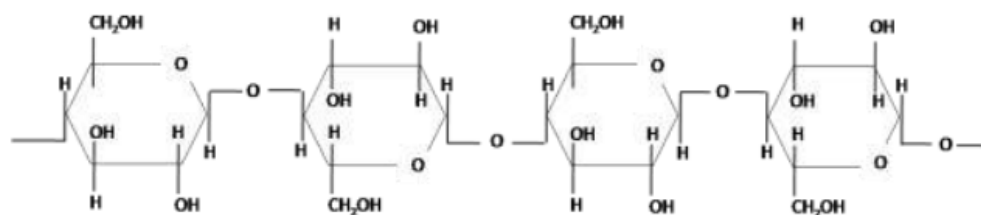
Kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin yang terdapat dalam suatu biomassa memiliki persentase masing-masing sesuai jenis biomassa. Kandungan lignoselulosa yang terdapat pada jenis kayu yaitu:

### 1. Kandungan Selulosa

Selulosa merupakan komponen utama dari ligniselulosa biomassa dengan konsentrasi berkisar 40-50% dari berat kering. Selulosa merupakan *homopolysaccharide* terdiri dari unit berulang  $\beta$ -D-glukopiranos. Tingkat polimerisasi dan kristalinitas selulosa memiliki dampak signifikan dalam proses hidrolisis (asam dan enzimatis) ( Joshi dkk., 2011).

Selulosa adalah polimer  $\beta$ -glukosa dengan ikatan  $\beta$ -1, 4 diantara satuan glukosanya. Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain dan lignin dalam jumlah yang beragam. Molekul selulosa memanjang dan kaku, meskipun dalam larutan. Gugus hidroksil yang menonjol

dari rantai dapat membentuk ikatan hidrogen dengan mudah, mengakibatkan kekristalan dalam batas tertentu Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.1. Selulosa ditemukan terikat kuat dengan hemiselulosa dan dilapisi oleh lignin membentuk lignoselulosa kompleks sehingga untuk membebaskan ikatan tersebut diperlukan tahapan awal yang penting yaitu *pretreatment* (Joshi dkk., 2011).

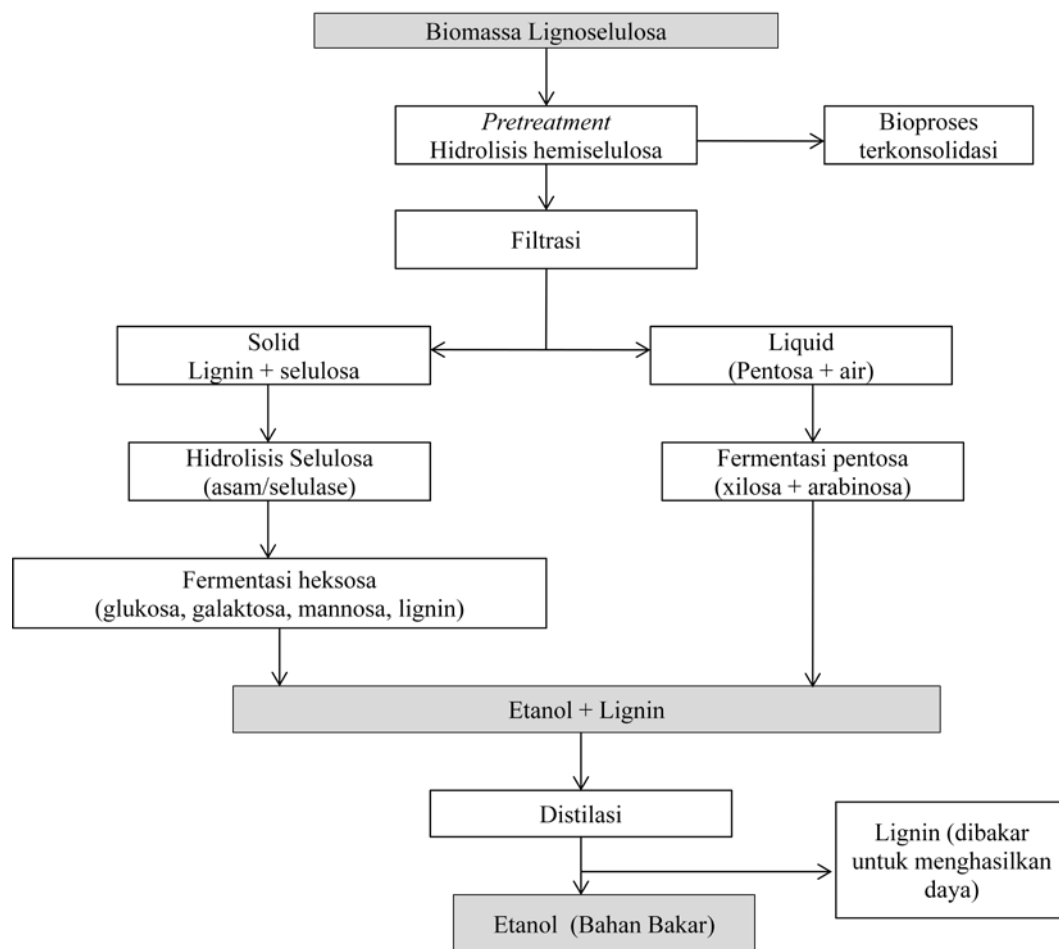


Gambar 2.1 Struktur Selulosa (Joshi dkk., 2011).

Selulosa merupakan glukana paling penting yang tersusun oleh sakarida homopolimer selobiosa yang terdiri dari dua molekul  $\alpha$ -D-glukosa yang terikat dalam ikatan  $\beta$ -(1-4)- glikosidik dan dapat berputar untuk membentuk ikatan intramolekul dan intermolekul (Bobleter, 2005). Dalam banyak penelitian, eceng gondok dikeringkan untuk mempermudah penanganannya, tetapi selulosa mengalami modifikasi fisik berupa penciutan (disebut juga hornifikasi) yang dapat menghambat sakarifikasi saat didehidrasi (Arantes dan Saddler, 2011; Zhu, 2011; Houghton dkk. 2006).

## 2. Kandungan Hemiselulosa pada Biomassa

Hemiselulosa termasuk komponen yang kurang kompleks, konsentrasi dalam biomassa lignoselulosa adalah 25% sampai 35% sehingga mudah dihidrolisis untuk gula fermentasi. Hemiselulosa adalah sakarida heteropoli terdiri dari pentosa (D-xilosa dan D-arabinosa), heksosa (D-mannose, D-glukosa dan D-galaktosa) dan asam gula (Joshi dkk., 2011). Proses pembentukan etanol dari ligniselulosa pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Skema Pembentukan Etanol (Joshi dkk., 2011).

### 3. Kandungan Lignin pada Biomassa

Lignin merupakan komponen utama ketiga lignoselulosa biomassa dan rentang konsentrasi sebesar 20% sampai 35%. Lignin berfungsi sebagai pendukung tanaman terhadap gangguan mikroba dan tekanan oksidasi sehingga menyebabkan tanaman sulit terdegradasi (Joshi dkk., 2011). Berbeda dengan selulosa dan hemiselulosa yang merupakan polimer karbohidrat, lignin merupakan polimer fenol. Lignin bersifat hidrofobik dan keberadaannya dalam lignoselulosa merintangi hancurnya sel tanaman oleh jamur dan bakteri. Ada 3 monomer lignin (lignol) yang ini tergabung ke lignin dalam bentuk alkohol fenil propionat: p-hidroksifenil propanol / alkohol koumaril (H), guaiasil propanol / alkohol koniferil (G) dan alkohol siringil/sinapil (S). Saat ini, organisme yang dianggap paling efektif dalam degradasi lignin adalah jamur akar putih (Kumar dkk., 2009).

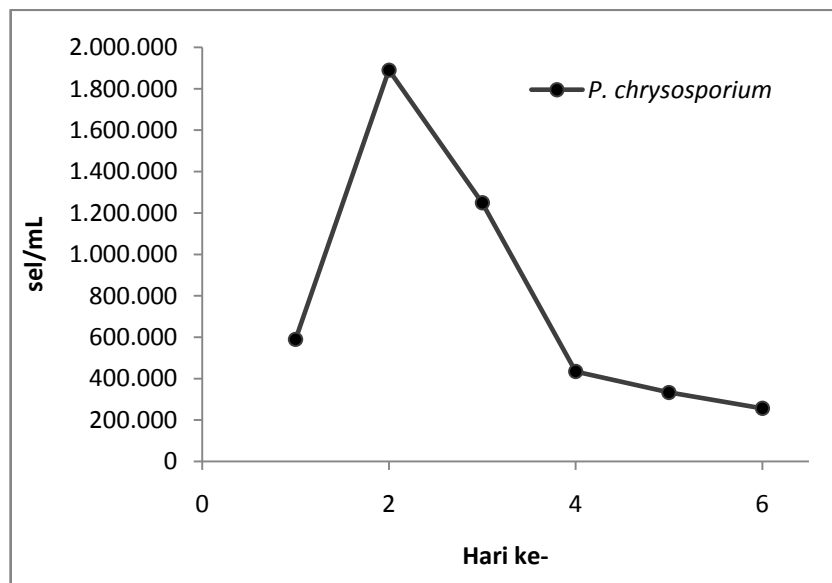
### 2.3 *Pretreatment* dan Manfaatnya pada Fermentasi

Salah satu rintangan utama dalam hidrolisis selulosa adalah karakteristik substrat yang tidak mendukung hidrolisis selulosa. Karakteristik ini kemudian dimodifikasi agar hidrolisis berlangsung lebih efisien (Huang dkk., 2011). Sebab itulah, *pretreatment* memiliki dampak besar pada seluruh operasi dan biasanya merupakan bagian paling mahal (Joshi dkk., 2011). *Pretreatment* umumnya berguna untuk membuka struktur lignoselulosa agar dapat diakses enzim (Huang dkk., 2011; Neves dkk., 2007).

Terdapat tiga metode *pretreatment* fisik, kimia dan biologi. Selain itu juga kombinasi dari ketiga metode tersebut. Faktor terpenting dalam proses *pretreatment* adalah untuk meningkatkan *bioavailabilitas* bahan baku untuk memecah struktur lignoselulosa yang kompleks. Metode *pretreatment* diperlukan dalam lignoselulosa untuk mendapatkan tingkat hidrolisis yang efisien (Ma dkk., 2010; Axelsson, 2011). Jamur yang dapat digunakan dalam proses *pretreatment* salah satunya *P. chrysosporium* karena mampu mendegradasi lignin (Sambusiti, 2012).

Jamur akar putih telah banyak diteliti dan digunakan untuk menguraikan lignin. Penggunaan jamur ini meliputi dalam proses *pulping*, dan *pretreatment* biomassa lignoselulosa. Tergantung jenisnya, jamur akar putih dapat bersifat *selective decay* maupun *nonselective decay*. Jamur ini memproduksi ligninase, hemiselulase, dan selulase (Kubicek, 2013).

*P. chrysosporium* mengalami masa pertumbuhan optimum selama 2 hari (fase eksponensial) (Novembrianto, 2014; Sanito 2014). Kurva pertumbuhan memperlihatkan jumlah sel yang berkembang terhadap waktu (Gambar 2.3), sehingga didapatkan usia starter yang tepat untuk inokulasi (Ivander, 2014).



Gambar 2.3. Kurva pertumbuhan *P. chrysosporium*  
(Novembrianto, 2014; Sanito, 2014).

## 2.4 Proses Hidrolisis

Hidrolisis adalah proses peruraian suatu senyawa oleh air. Proses tersebut dapat terjadi dalam suasana asam, basa, atau netral tergantung pada senyawa yang bereaksi serta karena enzim. Hidrolisis selulosa merupakan suatu proses yang dilakukan untuk menghasilkan glukosa. Ada dua cara yang digunakan untuk hidrolisis selulosa yaitu dalam suasana asam dan secara enzimatik (Soeprijanto, 2008). Proses hidrolisis mengubah polimer karbohidrat menjadi gula fermentasi sederhana. Prosesnya mengubah selulosa menjadi glukosa dan hemiselulosa menjadi pentosa/hexosa (Axelsson, 2011).

Mikroorganisme yang dapat digunakan untuk hidrolisis adalah *A. niger* (Brethauer dan Wyman, 2010). Menurut Novembrianto (2014), proses yang banyak menghasilkan laju reaksi pembentukan gula reduksi hidrolisis pada eceng gondok menggunakan *T. viride* dan *A. niger*. Kapang *A. niger* menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase dan enzim glucoamilase yang mampu memecah pati menjadi glukosa dan *Z. mobilis* guna mengubah glukosa menjadi etanol (Juairiah dkk., 2004). Penambahan *T. viride* dan *A. niger* dilakukan saat fase setengah pertumbuhan dengan mengacu pada kurva pertumbuhan (Gambar 2.4).

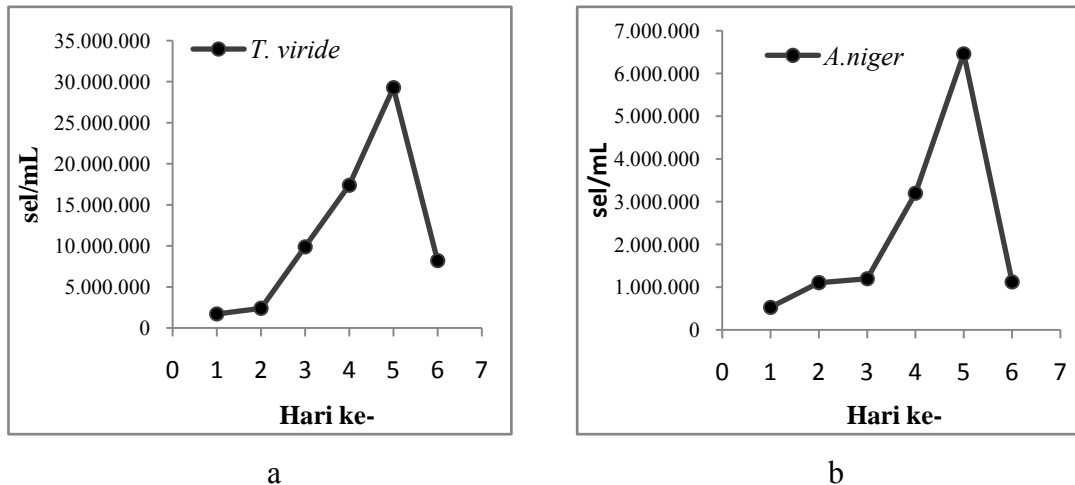
Tahap hidrolisis mentransformasi selulosa ke gula terfermentasi. Dua metode umum hidrolisis adalah hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatik. Metode

hidrolisis lain adalah hidrolisis termal yang sangat jarang digunakan. Hidrolisis enzimatis lebih dipilih karena bekerja pada suhu wajar, menghasilkan *yield* tinggi dengan jumlah yang sedikit, merupakan senyawa alami yang dapat terbiodegradasi dan ramah lingkungan (Wyman, 1994).

Berikut persamaan (1) dan (2) pembentukan etanol dari selulosa dan hemiselulosa:



Salah satu perbedaan terbesar hidrolisis asam dan enzim adalah produk samping hidrolisis asam yang sangat beragam dan bersifat menghambat pertumbuhan. Selain itu, jenis hidrolisis asam menghasilkan limbah dan memerlukan penanganan khusus. Oleh sebab itulah, proses hidrolisis yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan jenis hidrolisis enzim.



Gambar 2.4. Kurva Pertumbuhan (a) *T. viride*, dan (b) *A. niger*  
(Novembrianto, 2014; Sanito, 2014)

## 2.5 Proses Fermentasi Etanol

Proses yang terjadi setelah adanya *pretreatment* yakni hidrolisis enzimatis untuk mengkonversi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula. Gula kemudian difermentasi menjadi etanol menggunakan ragi/bakteri. Proses pemisahan antara hidrolisis dan proses fermentasi disebut dengan *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Proses fermentasi dilakukan setelah proses preparasi bahan dan hidrolisis selulosa menjadi gula sederhana selesai dilakukan. Umumnya, proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme (Assad dkk., 2011).

Prinsip dasar fermentasi adalah mengaktifkan kegiatan mikroba tertentu untuk tujuan mengubah sifat bahan, agar dapat dihasilkan sesuatu yang bermanfaat seperti alkohol. Menurut Idris dkk. (2012), fermentasi alkohol atau alkoholisasi adalah proses perubahan gula menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub> oleh mikroba, terutama oleh khamir *S. cerevisiae*. Karbohidrat akan dipecah dahulu menjadi gula sederhana yaitu dengan hidrolisis pati menjadi unit-unit glukosa (Öhgren dkk., 2007).

Ada banyak jenis mikroorganisme yang telah dimanfaatkan untuk fermentasi bioetanol, termasuk bakteri, kapang, dan fungi. Contoh mikroorganisme yang digunakan yaitu *Z. mobilis* dan *E. coli* (bakteri), dan *S. cerevisiae* (kapang). Mikroorganisme ini dipilih karena kemampuannya untuk mengubah gula sederhana menjadi etanol. *Z. mobilis* misalnya, mampu menghasilkan rendemen bioetanol yang tinggi. Namun demikian bakteri ini mempunyai keterbatasan, karena hanya mampu memfermentasi glukosa, fruktosa, dan sukrosa, berbeda dengan *S. cerevisiae* dan *E. coli* yang mampu memfermentasi berbagai jenis gula (Assad dkk., 2011).

Ragi *S. cerevisiae* merupakan mikroorganisme yang paling disukai dalam fermentasi heksosa. Selain ragi, *Pichia stipitis* dan *Candida shehatae* juga mampu memfermentasi heksosa dan pentosa ke etanol (Joshi dkk., 2011). Gorsek dan Zajsek (2010) menemukan bahwa dalam jangkauan suhu 16°C sampai 30°C, produksi etanol oleh ragi meningkat. Selain intensifikasi proses, pengembangan juga dilakukan dalam sistem bioreaktor misalnya *external loop*

*liquid-lift bioreactor*, *circulating loop bioreactor*, bioreaktor membran, *ultrasonic airlift reactors*, *fluidized bed reactor* (Stang dkk., 2001; Roble dkk., 2003; Huang dkk., 2011).

Bioetanol adalah etanol atau etil alkohol ( $C_2H_5OH$ ), berbentuk cair, bening tidak berwarna, *biodegradable*, dan tidak menyebabkan korosi. Bioetanol pada umumnya diproduksi melalui proses biokimia (fermentasi) dan proses termokimia (gasifikasi) menggunakan bahan baku hayati sedangkan etanol dapat dibuat dengan cara sintesis melalui hidrasi katalitik dari etilen atau bisa juga dengan fermentasi gula menggunakan ragi *S. cerevisiae*. Beberapa bakteri seperti *Z. mobilis* juga diketahui memiliki kemampuan melakukan fermentasi untuk memproduksi etanol. Substrat yang umum digunakan untuk fermentasi adalah pati yang berasal dari jagung, gandum, dan gula tebu (molase) (Assadad dkk., 2010).

Teknik fermentasi dalam produksi bioetanol sampai saat ini masih belum efisien dengan produktivitas yang masih rendah dan membutuhkan modal yang besar. Produksi biomassa yang rendah selama proses fermentasi dan pembentukan produk samping selain etanol menyebabkan efisiensi yang rendah. Untuk meningkatkan produktivitas etanol, perlu dilakukan optimasi kondisi yang dapat dilakukan antara lain dengan cara mutagenesis, pemilihan substrat/bahan baku, dan kondisi fermentasi yang optimum. Secara teoritis, fermentasi glukosa akan menghasilkan etanol dan karbondioksida. Perbandingan mol antara glukosa dan etanol dapat dilihat pada diagram reaksi berikut:



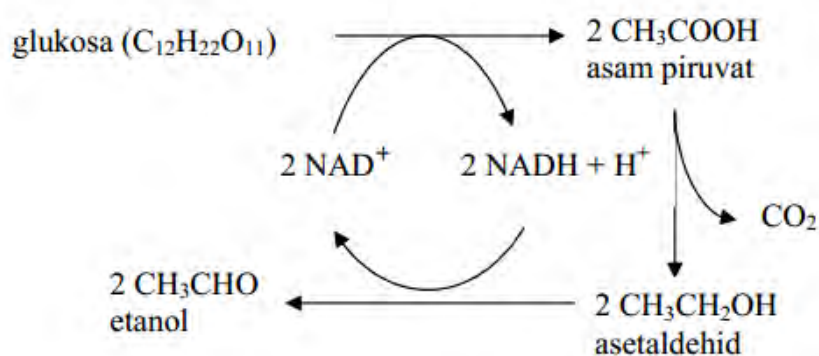
Satu mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol dan 2 mol karbondioksida, atau dengan perbandingan bobot tiap 180 g glukosa akan menghasilkan 90 g etanol. Melihat kondisi tersebut, perlu diupayakan penggunaan substrat yang murah untuk dapat menekan biaya produksi etanol sehingga harga produknya bisa lebih murah. Secara umum bioetanol digunakan untuk bahan baku industri, bahan minuman, bahan dasar industri farmasi dan kosmetika, serta untuk bahan bakar. Beberapa jenis etanol berdasarkan kandungan alkohol dan penggunaannya yang kita kenal yaitu: (1) etanol untuk industri (90–94,9% v/v), (2) *rectified ethanol* (95–96,5% v/v), (3) jenis etanol yang netral, aman untuk bahan minuman dan



farmasi (96–99,5% v/v), serta (4) etanol untuk bahan bakar (99,5–100% v/v) (Öhgren dkk., 2007).

Fermentasi etanol meliputi dua tahap (Fardiaz, 1992) yaitu :

1. Pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hidrogen melalui jalur EMP (*Embden-Meyerhoff-Parnas*), menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih teroksidasi daripada glukosa.
2. Senyawa yang teroksidasi tersebut direduksi kembali oleh atom hidrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama, membentuk senyawa-senyawa hasil fermentasi yaitu etanol dengan reaksi sebagai berikut:



Gambar 2.5 Reaksi Senyawa Pada Proses Fermentasi (Fardiaz, 1992).

Sesuai dengan persamaan di atas, hasil fermentasi etanol yang ideal adalah 51,1% etanol dan 48,9% karbondioksida. Pada umumnya fermentasi etanol menggunakan khamir *S. cerevisiae*. Produksi etanol dari substrat gula oleh khamir *S. cerevisiae* merupakan proses fermentasi dengan kinetika sangat sederhana. Disebut sederhana karena hanya melibatkan satu fase pertumbuhan dan produksi, pada fase tersebut glukosa diubah secara simultan menjadi biomassa, etanol dan  $CO_2$ . Fermentasi etanol oleh *S. cerevisiae* dapat dilakukan pada pH 4-5 dengan temperatur 27-35°C, proses ini dapat berlangsung 35-60 jam.

## 2.6 Pemanfaatan Etanol

Etanol merupakan bahan bakar oksigen dengan nilai oktan tinggi seperti bahan bakar minyak bumi. Etanol dapat menjalankan mesin dengan pembakaran yang lebih tinggi sehingga kinerja lebih efektif. Campuran bioetanol yang dipakai

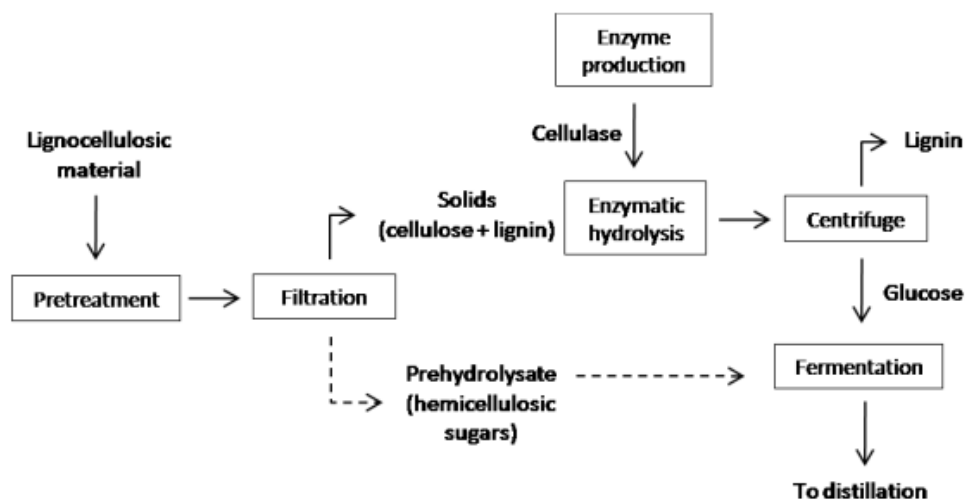
dalam mobil dapat mengurangi bahan bakar yang berasal dari minyak bumi dan pelepasan emisi gas rumah kaca serta dapat menjadi aditif yang lebih aman. Etanol dapat diproduksi dari produk minyak bumi atau dari biomassa. Hampir sebagian besar etanol diproduksi dari sumber daya yang terbarukan baik dari tebu, tepung dan biji-bijian. Teknologi yang berkembang yaitu dengan biomassa lignoselulosa untuk menghasilkan etanol dengan biaya rendah. Biomassa lignoselulosa terdiri dari lignin, selulosa, hemiselulosa, pektin dan komponen lainnya (Juairiah dkk., 2004).

Etanol yang dapat digunakan sebagai bahan bakar yaitu etanol 10%. Campuran etanol-bensin sebagai bahan bakar kendaraan bermotor dengan perbandingan 10% etanol: 90% bensin disebut gasohol. Konsentrasi etanol untuk bahan bakar dapat ditingkatkan sampai dengan 85% (E85). Etanol sebagai bahan bakar kendaraan mempunyai beberapa keuntungan, antara lain: (i) etanol diproduksi dari sumber daya yang dapat diperbaharui, terutama dari produk pertanian atau dari sampah pertanian, (ii) pembakaran etanol lebih bersih daripada bahan bakar fosil, (iii) etanol dapat mengurangi efek rumah kaca (Juairiah dkk., 2004).

## **2.7 Metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF)**

Konsep SHF merupakan pemisahan antara proses hidrolisis dan fermentasi dengan reaksi pada unit yang terpisah. *Pretreatment* bahan lignoselulosa merupakan unit pertama yang terdegradasi menjadi gula monomer oleh selulosa dan selanjutnya difermentasi menjadi etanol pada reaktor yang sama setelah hidrolisis. Keuntungan metode ini adalah terjadinya dua proses (hidrolisis dan fermentasi) pada kondisi masing-masing yang berbeda. Hidrolisis selulosa berlangsung baik pada suhu antara 45-50° C sedangkan fermentasi berlangsung pada suhu optimum 30-37° C. Keuntungan lainnya adalah kemungkinan adanya proses fermentasi secara terus menerus dengan daur ulang sel karena lignin telah terurai sebelum terjadinya proses fermentasi. Kelemahan SHF adalah adanya resiko kontaminasi karena waktu yang lama selama proses hidrolisis dan adanya resiko kontaminasi mikroba dari pemecahan gula reduksi (Axelsson, 2011).

Metode fermentasi lainnya adalah SSF Tahap hidrolisis selulosa dan fermentasi digabung. Secara umum meningkatkan kinetika fermentasi dan ekonomi karena mengurangi akumulasi gula yang menghambat enzim dan adanya etanol mengurangi kontaminasi mikroba. Kelemahannya adalah kondisi optimal enzim dan mikroba mungkin berbeda dan banyak gula dipakai untuk pertumbuhan ragi (Neves dkk., 2007).



Gambar 2.6 Tahapan Produksi Etanol Menggunakan Metode SHF  
(Axelsson, 2011).

## 2.8 Mikroorganisme Pengkonversi Gula Reduksi

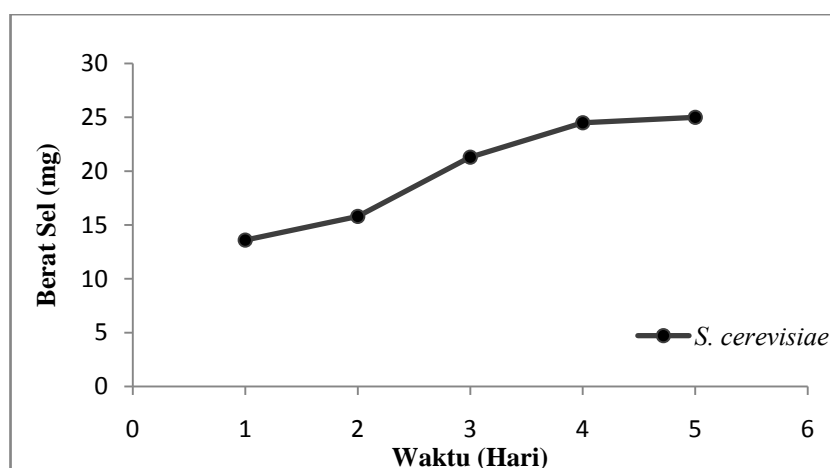
Pembuatan etanol dilakukan melalui proses fermentasi. Fermentasi adalah peruraian senyawa organik menjadi senyawa sederhana dengan bantuan mikroorganisme sehingga menghasilkan energi. Fermentasi etanol skala komersial sebagian besar dilakukan oleh jamur, salah satunya *S. cerevisiae* yang menghasilkan etanol (Muslihah dkk., 2011).

### 1. *Saccharomyces cerevisiae*

Penggunaan *S. cerevisiae* dalam produksi etanol secara fermentasi telah banyak dikembangkan di beberapa negara, seperti Brasil, Afrika Selatan, dan Amerika Serikat. Hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* dapat memproduksi etanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap alkohol yang tinggi. Produksi Etanol Menggunakan *S. Cerevisiae*. Adapun klasifikasi *S. cerevisiae* adalah sebagai berikut:

*Kingdom* : *Fungi*  
*Phylum* : *Ascomycota*  
*Subphylum* : *Saccharomycotina*  
*Class* : *Saccharomycetes*  
*Order* : *Saccharomycetales*  
*Famlyli* : *Saccharomycetaceae*  
*Genus* : *Saccharomyces*  
*Spesies* : *S. cerevisiae*  
*Binomial name* : *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* berbentuk bulat, oval, atau memanjang, dan mungkin berbentuk *pseudomiselium*. Reproduksi khamir dilakukan dengan cara pertunasan multipolar, atau melalui pembentukan askospora. Askospora dapat terbentuk setelah terjadi konjugasi, atau berasal dari sel diploid. Oleh karena itu Ragi (*S. cerevisiae*) adalah mikroorganisme penghasil etanol yang paling dikenal saat ini. Efisiensi fermentasi dapat ditingkatkan dengan cara mengamobilisasi sel mikroorganisme yang digunakan (Gambar 2.7). Amobilisasi sel bertujuan untuk membuat sel menjadi tidak bergerak atau berkurang ruang gerakannya sehingga sel menjadi terhambat pertumbuhannya dan substrat yang diberikan hanya digunakan untuk menghasilkan produk (Elefri, 2006).



Gambar 2.7. Kurva Pertumbuhan *S. cerevisiae*  
 (Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga, 2014).

## 2. *Zymomonas mobilis*

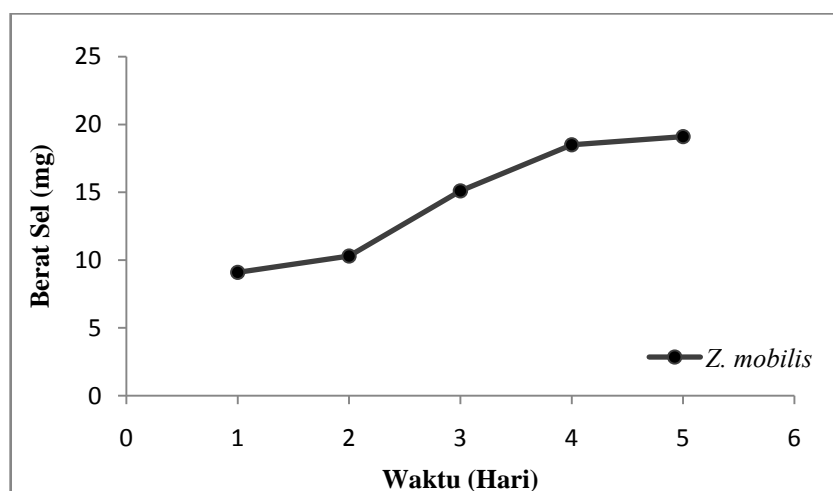
Selain *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* juga sangat potensial, namun bakteri ini perlu dikembangkan lebih lanjut, karena toleransinya yang rendah terhadap garam dalam media dan membutuhkan media yang steril, sehingga menyulitkan untuk aplikasi skala industri (Elefri, 2006). Teknologi fermentasi menggunakan *Z. mobilis* telah direkomendasikan karena terbukti dapat digunakan dalam proses fermentasi dalam kondisi anaerobik dengan serapan glukosa dan produksi etanol yang cepat (Sulaimani, 2012). Berikut klasifikasi *Z. mobilis*:

<i>Kingdom</i>	: <i>Bacteria</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Proteobacteria</i>
<i>Class</i>	: <i>Alpha Proteobacteria</i>
<i>Order</i>	: <i>Sphingomonadales</i>
<i>Family</i>	: <i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Zymomonas</i>
<i>Species</i>	: <i>Z. mobilis</i>
<i>Binomial name</i>	: <i>Zymomonas mobilis</i>

Menurut Sapariantin dkk. (2006), pemilihan bakteri fermentatif berdasarkan pada beberapa keunggulan yang dimiliki antara lain mampu tumbuh dan mengonsumsi gula dengan cepat menggunakan jalur *Entner-Doudoroff* (ED) (sekitar 1  $\mu$ mol glukosa per menit per mg protein sel), toleran terhadap konsentrasi substrat tinggi hingga 30% glukosa, toleran terhadap suhu tinggi hingga 40°C, toleran terhadap kadar etanol tinggi hingga 16% (v/v), dan mampu menghasilkan etanol hingga 13% (w/v) (Kartikasari, 2013).

*S. cerevisiae* ternyata memiliki beberapa kekurangan, diantaranya adalah tidak tahan dengan konsentrasi tinggi dari etanol yang dihasilkan. *Z. mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan *S. cerevisiae*, diantaranya lebih toleran terhadap suhu, pH rendah, serta tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi. pH yang efektif untuk pertumbuhan *Z. mobilis* adalah 4- 6,5 dan *Z. mobilis* dapat menguraikan glukosa, fruktosa, dan sukrosa untuk memproduksi etanol (Muslihah dkk., 2011).

Etanol umumnya diproduksi melalui fermentasi mikroorganisme etanologenik. Meskipun beberapa mikroorganisme telah dimasukkan sebagai mikroorganisme etanologenik, tetapi khamir *S. cerevisiae* dan bakteri *Z. mobilis* merupakan mikroorganisme terbaik untuk produksi etanol. Jumlah sel *Z. mobilis* meningkat seiring bertambahnya lama fermentasi. Jumlah sel *Z. mobilis* tertinggi diperoleh pada media dengan lama fermentasi 3 hari (Gambar 2.8). Sedangkan produksi etanol pada hari ke-2 dan hari ke-3 tidak terlalu berbeda jauh, hal itu dikarenakan kemungkinan hari ke-3 *Z. mobilis* lebih banyak melakukan fermentasi sukrosa. Fermentasi sukrosa oleh *Z. mobilis* menghasilkan produksi etanol yang rendah (Sapariantin dkk., 2005).



Gambar 2.8. Kurva Pertumbuhan *Z. mobilis*  
(Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga, 2014)

## 2.9 Pengukuran Kadar Etanol

Angka kadar alkohol pada cairan menunjukkan perbandingannya dengan air. Alkohol bersifat mudah menguap karena rentang rantai karbon  $C_1$  sampai  $C_5$  mempunyai titik didih  $0^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$ . Pada saat ini, kadar etanol paling tinggi yang ada di pasaran adalah 96% untuk konsentrasi teknis. Ada banyak cara untuk mengukur kadar etanol dan setiap metode pengukuran memiliki keunggulan dan kekurangannya masing-masing. Beberapa metode itu adalah analisis menggunakan *Gas Chromatography* (GC), analisis dengan *High Performance*

*Liquid Chromatography* (HPLC), metode enzim, dan metode dengan menggunakan hidrometer alkohol (Adiprabowo, 2011).

### **2.10 Percobaan Faktorial $2^k$**

Variabel bebas yang sering digunakan dalam suatu eksperimen akan memberikan efek, pengaruh atau akibat pada variabel tak bebas atau variabel respon. Ada juga variabel respon yang nilainya berubah-ubah dikarenakan efek variabel bebas dengan nilai berubah-ubah pula. Variabel bebas ini dinamakan faktor dan nilai-nilai atau klasifikasi- klasifikasi dari sebuah faktor dinamakan taraf faktor (macam perlakuan) (Hafiz, 2008).

Eksperimen Faktorial yaitu terjadinya persilangan antara setiap taraf sehingga terbentuk kombinasi perlakuan. Eksperimen faktor  $2^k$  merupakan eksperimen yang melibatkan  $k$  buah faktor yang masing - masing dengan taraf dua. Hasil yang didapati dari  $2^k$  berupa kombinasi perlakuan sehingga memerlukan sejumlah eksperimen untuk satu kali replikasi. Dalam eksperimen faktorial  $2^k$  dengan replikasi sebanyak  $r$  dalam tiap sel adalah  $r \cdot 2^k$ . Sehingga untuk satu kali replikasi ( $r = 1$ ) saja Menghasilkan eksperimen yang jumlahnya tidak ekonomis dan tidak efisien dalam praktek, bahkan dalam beberapa hal tidak mungkin dilakukan. Kesulitan yang dihadapi yaitu saat  $k$  membesar bernilai tiga atau lebih yang apabila kombinasi perlakuan diperoleh ternyata bersifat signifikan dalam eksperimen. Karena itu untuk menghindari kesulitan-kesulitan yang ada sering tidak semua eksperimen atau keseluruhan replikasi dilakukan, akan tetapi diambil hanya sebagiannya ( $r = 1/2$ ) saja, dalam hal ini diambil setengah replikasi (Hafiz, 2008).

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

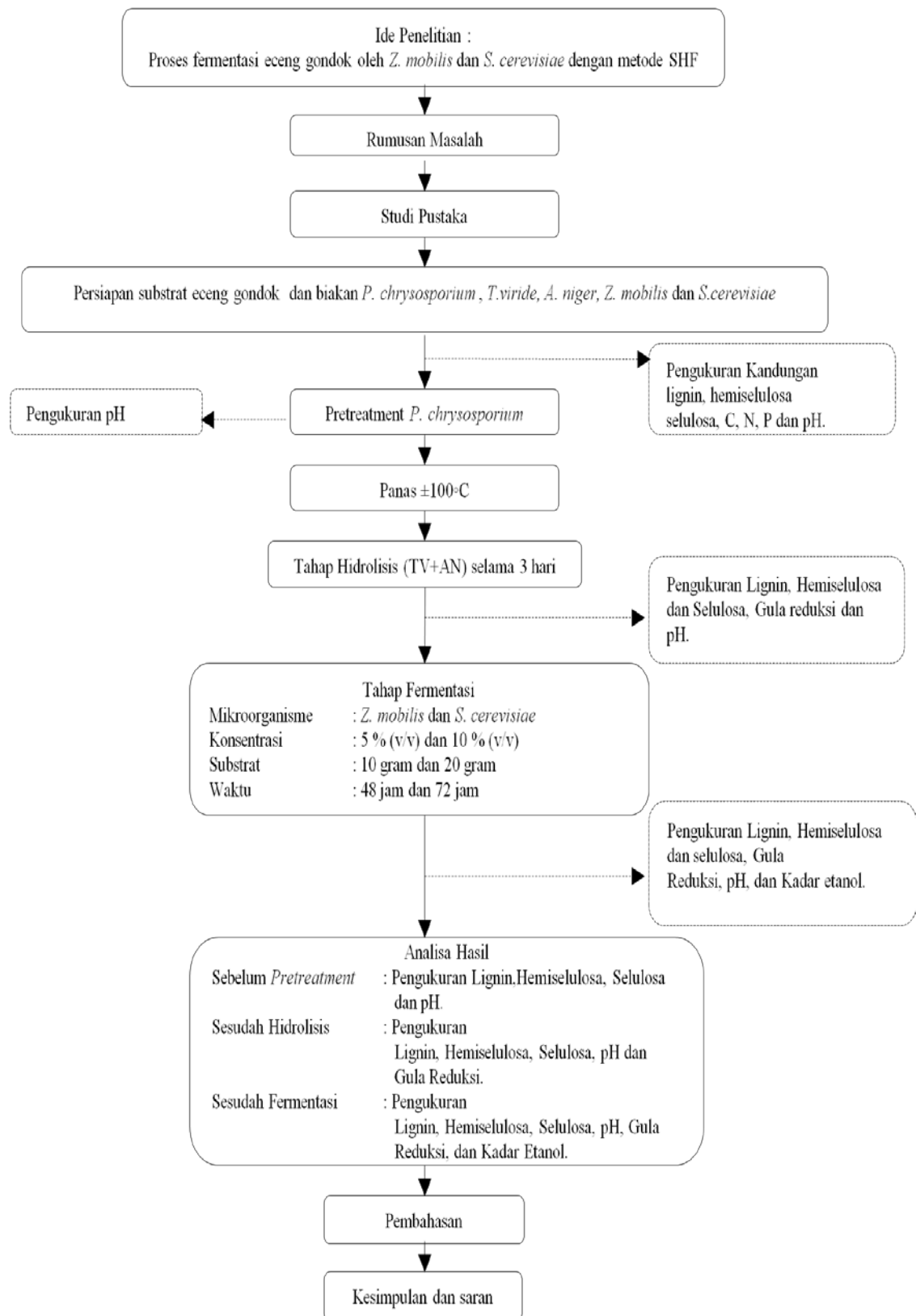
Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan eceng gondok yang termasuk limbah di perairan sebagai bahan baku pembuatan etanol. Proses fermentasi menggunakan bakteri *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dengan metode SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*). Tahapan proses SHF diawali dengan pretreatment, hidrolisis dan terakhir fermentasi.

#### **3.1 Ide Penelitian**

Ide penelitian ini diperoleh berdasarkan permasalahan banyaknya eceng gondok yang tumbuh di perairan. Perkembangannya yang begitu pesat di wilayah yang mengandung banyak nutrisi dapat menyebabkan eutrofikasi sehingga merusak ekosistem perairan. Limbah eceng gondok tersebut selama ini tidak dimanfaatkan sehingga menjadikan permasalahan baru, oleh karena itulah perlunya memanfaatkan limbah eceng gondok yang semula tidak bermanfaat menjadi sesuatu yang lebih bernilai. Salah satunya sebagai bahan fermentasi menjadi bioetanol.

Fermentasi dilakukan menggunakan substrat yang berasal dari eceng gondok sehingga gula reduksi yang terdapat di dalamnya dapat dikonversi menjadi bioetanol. Proses *pretreatment* yang telah dilakukan oleh Febriani (2014), didapatkan hasil yang optimum untuk dijadikan sebagai *pretreatment* pada penelitian ini. Selanjutnya penelitian yang dilakukan oleh Novembrianto (2014) dijadikan sebagai acuan untuk proses hidrolisis menggunakan *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger*. Tahapan penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.





Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

### 3.2 Rumusan Masalah

Mikroorganisme yang dipilih pada penelitian fermentasi ini adalah mikroorganisme yang diketahui mampu mereduksi gula menjadi etanol, selain itu komposisi penambahan mikroorganisme dilakukan untuk mengetahui komposisi optimum mikroorganisme yang diperlukan untuk menghasilkan etanol.

### 3.3 Studi Pustaka

Penulisan dilakukan dengan menggunakan beberapa literatur yang dipakai sebagai referensi yang berasal dari penelitian yang terkait dengan penelitian yang akan dilakukan. Referensi yang dipakai diantaranya berasal dari disertasi, tesis, skripsi, buku, jurnal ilmiah, dan artikel ilmiah.

### 3.4 Tahap Persiapan

Tahap persiapan meliputi persiapan substrat dan pembiakan mikroorganisme yang akan digunakan dalam penelitian.

#### 1. Persiapan Substrat Eceng Gondok

Tahap persiapan diawali dengan pengambilan eceng gondok yang terdapat di area perairan perumahan penduduk sekitar kampus ITS Sukolilo, Surabaya. Eceng gondok yang telah diambil dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel serta membuang bagian akarnya dan memisahkan bagian batang dan daun. Bagian batang dicacah menggunakan pisau sampai ukuran eceng gondok menjadi kecil  $\pm 5$  mm, sedangkan daunnya dicacah dengan ukuran panjang  $\pm 4$  cm. Eceng gondok yang telah dicacah dikeringkan selama 1 minggu sampai warnanya kecoklatan dan kering. Selanjutnya digerus menjadi serbuk kasar (tanpa disaring) dan disimpan dalam plastik untuk menjaga agar tetap kering.

#### 2. Pembiakan Mikroorganisme

Tahap persiapan selanjutnya yaitu memperbanyak biakan *P. chrysosporium*, *T. viride*, dan *A. niger* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Persiapan media biakan dilakukan dengan memasukkan PDA 3,9 gram ke dalam erlenmeyer 250 mL dan menambahkan akuades sebanyak 100 mL. PDA dilarutkan dengan pemanasan menggunakan *hot plate* dan diaduk sampai homogen. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator.

Mengembangbiakkan *P. chrysosporium*, *T. viride*, dan *A. niger* dilakukan setelah media PDA disterilisasi di *autoclave* kemudian dimiringkan untuk memperbesar luas permukaan media. Selanjutnya mengambil sampel biakan jamur satu ohse *P. chrysosporium*, *T. viride*, dan *A. niger* dan menanamkannya pada masing-masing media PDA.

### 3. Pembuatan *Starter*

Tahap persiapan *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi dilakukan dengan pembuatan starter untuk dimasukkan ke substrat (media fermentasi). *P. chrysosporium*, *T. viride*, *A. niger*, *Z. mobilis* 08BET, dan *S. cerevisiae* 08BET dipindahkan dari PDA ke PDB dan YMB.

*Starter* untuk *pretreatment* yaitu dengan menambahkan inokulum *P. chrysosporium*. *P. chrysosporium* diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 250 mL pada media PDB dengan volum 100 mL dan dishaker 100 rpm selama 3 hari.

*Starter* untuk hidrolisis menggunakan jamur *T. viride* dan *A. niger*. Selanjutnya mengambil masing-masing 1 ohse. Menginokulasi ke dalam masing-masing media PDB 100 mL pada erlenmeyer ukuran 250 mL dan menshaker 150 rpm selama 72 jam untuk *T. viride* dan *A. niger*.

*Starter* untuk hidrolisis menggunakan jamur *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*. Selanjutnya mengambil biakan pada media PDA dengan pengenceran untuk mengambil biakan yang tumbuh pada media PDA dan memindahkannya ke dalam media PDB 200 mL dan media *Yeast malt broth* untuk *S. cerevisiae* pada erlenmeyer ukuran 250 mL dan menshaker 150 rpm selama 60 jam.

### 3.5 Tahap *Pretreatment*

Eceng gondok yang telah diolah menjadi substrat dipersiapkan sebanyak 20 sampel dengan dua variasi berat substrat 10 gram dan 20 gram dan menambahkan akuades pada setiap sampel. Penelitian dilakukan dengan penambahan akuades dan substrat perbandingan yaitu 15 : 5, dimana 15 mL akuades ditambahkan ke dalam 5 gram substrat. Variasi substrat yang dipakai dalam penelitian ini sebanyak 10 g dan 20 gram, sehingga 20 variasi sampel ditambahkan akuades sebanyak 30 ml untuk substrat 10 gram dan 60 ml untuk

substrat 20 gram ( 16 botol untuk variasi dan 4 botol untuk kontrol). Media fermentasi (reaktor + substrat) yang dipakai sebelumnya disterilisasi 60 menit dengan pemanasan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C. Kemudian sampel dimasukkan inokulan *P. chrysosporium*, untuk 1 gram substrat dimasukkan 1 mL *P. chrysosporium* (Handayani dan Pandebesie, 2014; Novembrianto dan Pandebesie, 2014) dilakukan pengukuran pH dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Sampel yang telah diinkubasi selama 10 hari dipanaskan dengan suhu 100 °C selama 30 menit (Harun dkk., 2011; Novembrianto dan Pandebesie, 2014) dan selanjutnya diukur lignin, hemiselulosa, selulosa dan pH.

### **3.6 Tahap Hidrolisis**

Proses hidrolisis dilakukan setelah proses *pretreatment* dan pemanasan dilakukan. Media fermentasi 10 gram dan 20 gram substrat ditambahkan akuades masing-masing 100 mL dan diaduk. Proses hidrolisis menggunakan *T. viride* + *A. niger* sebanyak 1 mL untuk 1 gram substrat yang selanjutnya diinkubasi selama 72 jam untuk mencapai kondisi optimum (Novembrianto dan Pandebesie, 2014). Perbandingan *T. viride* dan *A. niger* yaitu 2:1 (Safaria dkk., 2013; Novembrianto dan Pandebesie, 2014; Sutarno dkk., 2013). Selanjutnya diukur lignin, hemiselulosa, selulosa, pH dan kadar gula reduksi.

### **3.7 Tahap Fermentasi dan Perlakuan Variabel**

Fermentasi pada penelitian dilakukan dengan metode SHF. Pada tahap fermentasi ini penambahan mikroorganisme dilakukan setelah proses hidrolisis selama 72 jam. *Z. mobilis* merupakan bakteri yang terbukti dapat mereduksi gula menjadi etanol (Kusumaningati, 2013) serta jamur *S. cerevisiae* yang diketahui menghasilkan konsentrasi tinggi etanol (Wignyanto, 2001). Konsentrasi *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* divariasikan dengan persentase yang sama 5% (v/v) dan 10% (v/v). Proses fermentasi dilakukan selama 72 jam. Pengambilan sampel untuk mengukur pH, kadar gula reduksi dan kadar etanol dilakukan pada jam ke 48 dan kadar lignin, hemiselulosa, selulosa, pH, kadar gula reduksi dan kadar etanol 72.

Prosedur proses fermentasi yang akan dilakukan adalah:

1. 2 sampel substrat 10 gram ditambahkan inoculan *S. cerevisiae* 5% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
2. 2 sampel substrat 10 gram ditambahkan inoculan *S. cerevisiae* 10% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
3. 2 sampel substrat 10 gram ditambahkan inoculan *Z. mobilis* 5% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
4. 2 sampel substrat 10 gram ditambahkan inoculan *Z. mobilis* 10% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
5. 2 sampel substrat 20 gram ditambahkan inoculan *S. cerevisiae* 5% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
6. 2 sampel substrat 20 gram ditambahkan inoculan *S. cerevisiae* 10% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
7. 2 sampel substrat 20 gram ditambahkan inoculan *Z. mobilis* 5% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
8. 2 sampel substrat 20 gram ditambahkan inoculan *Z. mobilis* 10% (v/v) dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
9. 2 sampel substrat 10 gram sebagai kontrol hasil hidrolisis *T. viride* dan *A. niger* tanpa penambahan *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.
10. 2 sampel substrat 20 gram sebagai kontrol hasil hidrolisis *T. viride* dan *A. niger* tanpa penambahan *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dengan waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam.

Tabel 3.1. Data Kadar Etanol Proses Fermentasi Metode SHF

M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		
Waktu	Substrat (gram)	5% (v/v)	10% (v/v)	5% (v/v)	10% (v/v)	Kontrol
48 jam	10	Y11111	Y12111	Y21111	Y22111	Kontrol 1.1
		Y11112	Y12112	Y21112	Y22112	Kontrol 1.2
	20	Y11121	Y12121	Y21121	Y22121	Kontrol 2.1
		Y11122	Y12122	Y21122	Y22122	Kontrol 2.2
72 jam	10	Y11211	Y12211	Y21211	Y22211	Kontrol 1.1
		Y11212	Y12212	Y21212	Y22212	Kontrol 1.2
	20	Y11221	Y12221	Y21221	Y22221	Kontrol 2.1
		Y11222	Y12222	Y21222	Y22222	Kontrol 2.2

Keterangan : Kontrol yang dipakai adalah sampel yang tidak ditambahkan inokulum *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*.

### 3.8 Pengukuran Karakteristik Substrat

Pengukuran karakteristik dilakukan sebelum *pretreatment*, setelah hidrolisis dan setelah fermentasi. Analisa yang dilakukan meliputi kandungan:

1. Lignin, hemiselulosa, dan selulosa menggunakan metode Datta (Novembrianto dan Pandebesie, 2014).
2. pH menggunakan pH indikator.
3. Kadar gula reduksi menggunakan metode Nelson Somogyi (Novembrianto dan Pandebesie, 2014).
4. C menggunakan Metode *Gravimetri*.
5. P menggunakan *spektrofotometri*.
6. N menggunakan metode Kjeldahl.
7. Kadar etanol menggunakan GC (*Gas Chromatography*).

Analisa sebelum *pretreatment* meliputi kandungan lignin, hemiselulosa, selulosa pH, C N, dan P. Pada tahap selanjutnya kembali diukur kandungan lignin, hemiselulosa, hemiselulosa, pH dan mengukur kandungan kadar gula yang terbentuk setelah proses hidrolisis. Pengukuran pada proses fermentasi dilakukan sebanyak dua kali, dengan pengukuran lignin, hemiselulosa, selulosa, pH, kadar gula, C, N, P dan pengukuran kadar etanol. Pengukuran kadar etanol dilakukan

pada jam ke 48 dan 72 dengan metode *Gas Chromatography* (GC) di Laboratorium Universitas Surabaya.

### 3.9 Hasil dan Pembahasan

Hasil yang akan diperoleh dari penelitian ini berupa data lignin, selulosa dan hemiselulosa, kadar gula reduksi, pH dan kadar etanol. Bahasan terhadap hasil yaitu membandingkan kadar etanol yang diperoleh dari penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*. Selanjutnya menyimpulkan mikroorganisme dan penambahan konsentrasi terhadap pembentukan etanol pada kondisi optimum.

Kadar lignin, selulosa, hemiselulosa sebelum *pretreatment*, setelah hidrolisis, dan setelah fermentasi akan dibahas untuk mengetahui kandungan sebelum proses dan setelah proses.

Analisis statistika digunakan sebagai analisa data etanol menggunakan rancangan faktorial. Rancangan faktorial dicirikan oleh perlakuan yang merupakan komposisi dari semua kemungkinan kombinasi dari taraf-taraf dua faktor atau lebih. Istilah faktorial lebih mengacu pada bagaimana perlakuan-perlakuan yang akan diteliti disusun, tetapi tidak menyatakan bagaimana perlakuan-perlakuan tersebut ditempatkan pada unit-unit percobaan. Keuntungan dari percobaan faktorial yaitu mampu mendeteksi respon dari taraf masing-masing faktor serta interaksi antara dua faktor. Ada atau tidaknya pengaruh interaksi dapat dideteksi dari perilaku respon suatu faktor pada berbagai kondisi faktor yang lain.

Analisa hasil etanol dilakukan menggunakan *Respon Surface* (Minitab 16). Selanjutnya hasil statistik akan dijadikan sebagai dasar kesimpulan hasil penelitian. Metode *response surface* merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk melakukan proses optimasi respon pada percobaan dengan faktor perlakuan bersifat kuantitatif. Tujuan utama dari metode *response surface* adalah mendapatkan komposisi taraf perlakuan yang menghasilkan respon optimum. Secara umum, metode *response surface* dapat digambarkan secara visual melalui *response surface* plot dan kontur plot. Melalui plot tersebut dapat diketahui bentuk hubungan antara respon dengan variabel bebasnya.

### **3.10 Kesimpulan dan Saran**

Kesimpulan yang akan di rangkumkan berdasarkan tujuan yang telah ditentukan dalam penelitian ini serta beberapa penemuan lainnya yang dianggap penting pada penelitian ini. Saran selanjutnya diberikan sebagai penyempurnaan sebagai tindak lanjut untuk penelitian selanjutnya.



***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Eceng Gondok**

Preparasi eceng gondok dimaksudkan untuk mempermudah proses pembuatan bioetanol yang memiliki beberapa tahapan pengolahan. Eceng gondok dipreparasi sampai menjadi substrat kering berbentuk serbuk kasar (Lampiran 4). Proses preparasi yang meliputi tahap pemilahan, pengeringan sampai penggerusan merupakan salah satu tahapan proses hidrolisis. Pengeringan eceng gondok sampai berwarna kecoklatan mengindikasikan kadar air telah berkurang dan respirasi telah terhambat. Proses preparasi eceng gondok menjadi substrat kasar merupakan hidrolisis secara enzimatik karena permukaan selulosa menjadi lebih luas.

#### **4.2 Karakterisasi Substrat Eceng Gondok**

Karakterisasi komponen substrat eceng gondok yang telah kering dalam bentuk serbuk kasar dianalisis untuk mengetahui komponen awal substrat sebelum pengolahan. Adapun karakterisasi awal substrat meliputi pengukuran sebagai berikut:

##### **1. Pengukuran Kandungan C,N, dan P**

Pengukuran awal yang dilakukan adalah pengukuran kandungan C, N, dan P. Komponen ini merupakan organik yang berfungsi sebagai *supplay* nutrisi untuk mikroorganisme dalam pertumbuhannya. Komponen ini akan mempengaruhi perkembangbiakan mikroorganisme untuk proses *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi. Kandungan C, N dan P dalam substrat eceng gondok yang telah diukur pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Komponen C, N, P dalam Substrat Eceng Gondok

Karakteristik	Kadar (%)
C	44,44
N	6,15
P	1,92

Pada proses dekomposisi terjadi penguraian senyawa-senyawa karbon (C) menjadi senyawa karbon yang lebih sederhana sehingga media tumbuh yang dihasilkan mengandung C organik. Komponen C ini terbentuk dalam suatu ikatan rantai karbon lignoselulosa biomassa eceng gondok. Kandungan C berfungsi sebagai nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme. Mikroorganisme dikenal dengan protein sel tunggal sebagian besar mikroorganisme terbangun dari sel protein, adanya unsur N dapat berfungsi sebagai protein bagi mikroorganisme. Kandungan unsur N ini berkaitan dengan jumlah mikroorganisme yang nantinya tumbuh. Kadar P dalam tanaman lebih kecil dibandingkan Nitrogen, demikian dalam eceng gondok dari penelitian ini sebesar 1,92%. Unsur P memiliki pengaruh dalam metabolisme mikroorganisme. Fungsi penting P adalah sebagai sumber energi untuk metabolisme sel, proses metabolisme ini terjadi secara enzimatik menggunakan katalisator enzim.

## 2. Pengukuran Kadar Lignoselulosa Sebelum *Pretreatment*

Proses fermentasi menjadi bioetanol membutuhkan bahan baku biomassa yang memiliki kandungan lignoselulosa. Pada proses fermentasi akan mengubah kandungan yang terdapat didalam substrat eceng gondok. Sebelum proses *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi, kandungan lignoselulosa eceng gondok diukur untuk mengetahui karakteristiknya. Komponen lignoselulosa sebelum pengolahan ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Kadar Awal Lignoselulosa Hasil Penelitian

Lignin (%)	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Sumber
<b>6,87</b>	<b>19,4</b>	<b>33,51</b>	<b>Hasil Penelitian</b>
8,76	12,38	33,95	(Novembrianto dan Pandebesie, 2014)
2,8	18,2	29,3	(Maddik, 2010)
3,50	18,20	48,70	(Nigam, 2002)
10,22	46,42	20,73	(Febriani, 2013)

Substrat eceng gondok yang telah dikarakterisasi memiliki komponen lignoselulosa dengan persentase lignin 6,87%, selulosa sebanyak 19,4% , dan hemiselulosa 33,51%. Berdasarkan persentase tersebut, komponen dengan presentasi terbanyak adalah hemiselulosa. Hasil ini berbeda dengan hasil analisis Novembrianto dan Pandebesie (2014) dengan preparasi pengeringan menggunakan oven dan substrat halus, memiliki kadar lignin 8,76%, selulosa 12,38% dan hemiselulosa 33,95%. Kandungan selulosa yang lebih sedikit dibanding dengan hasil penelitian. Adapun penelitian Nigam (2002) dengan preparasi eceng gondok dengan cara yang sama dan serbuk yang lebih halus, menghasilkan kadar lignin 3,50%, selulosa 18,20% dan hemiselulosa 48,70%. Hal yang berbeda dari perbandingan komponen lignoselulosa ditunjukkan Febriani (2013) dengan substrat eceng gondok halus yang menyatakan komponen selulosa pada substrat eceng gondok lebih besar dibandingkan hemiselulosa. Komponen hemiselulosa hanya 20,73% sedangkan selulosa mencapai 46,42% dan komponen terkecil lignin sebanyak 10,22%.

Komponen hemiselulosa dalam beberapa analisis memiliki kecenderungan lebih banyak dibandingkan kadar selulosa (Tabel 4.2). Komponen utama biomassa pada dasarnya tidak berdiri sendiri tetapi tergabung dalam suatu matriks dimana selulosa terisolasi oleh hemiselulosa dan lignin. Menurut Taherzade (2008), selulosa dalam bahan lignoselulosa merupakan sumber karbon organik sehingga bahan tersebut dapat menjadi bahan baku potensial untuk pembuatan bioetanol. Kadar hemiselulosa memiliki persentase lebih besar dibandingkan selulosa dalam komponen holoselulosa (hemiselulosa dan selulosa) (Sagar dkk., 2013). Komponen selulosa ini merupakan komponen yang dapat didegradasi mikroorganisme menjadi komponen monomer selulosa yakni glukosa dan disakarida selulosa (selobiosa). Pada komponen hemiselulosa akan didegradasi menjadi monomer gula yakni xylosa yang selanjutnya komponen-komponen tersebut akan dikonversi menjadi etanol (Samsuri, 2007).

#### **4.3 Pretreatment Substrat Eceng Gondok Menggunakan *P. chrysosporium* dan Hidrolisis Menggunakan *T. viride* dan *A. niger*.**

*Pretreatment* secara biologis dengan penambahan *P. chrysosporium* untuk memecah struktur lignin pada eceng gondok. Penggunaan mikroorganisme dalam pendegradasi lignin seperti jamur pelapuk putih yang pada penelitian ini adalah *P. chrysosporium* dikarenakan metode ini dianggap hemat, ramah lingkungan dan hemat energi. Hal ini disebabkan perlakuan pada suhu rendah (suhu ruang) dan tidak memerlukan bahan kimia (Gozan, 2014).

Kemampuan *P. chrysosporium* mendegradasi lignin karena mampu menghasilkan persil radikal dan enzim lignolitik yang mampu mendegradasi lignin pada ikatan fenolnya. *P. chrysosporium* dibiakkan selama 2 hari, koloni *P. chrysosporium* tumbuh kesegala arah dalam media PDA saat peremajaan. Persiapan *pretreatment* dilakukan dengan mempersiapkan starter *P. chrysosporium* yang telah di shaker selama 36 jam. Pada media PDB yang dishaker terjadi pertumbuhan *P. chrysosporium* yang ditandai dengan adanya spora berupa bulatan kecil berwarna putih.

Proses *pretreatment* dilakukan dengan inkubasi *P. chrysosporium* selama 10 hari. *P. chrysosporium* yang telah diperbanyak pada media PDB dipindahkan ke media substrat eceng gondok. Selama proses ini terjadi perkembangbiakan *P. chrysosporium* berupa spora putih pada permukaan substrat eceng gondok dalam reaktor. Pertumbuhan pada setiap sampel secara keseluruhan tidak merata, disebabkan kemampuan masing-masing sel dalam beradaptasi terhadap substrat. Perbedaan *P. chrysosporium* yang tumbuh pada media disebabkan beberapa faktor, misalnya pH dan kandungan nutrisi media. *P. chrysosporium* optimum pada pH 4-7 kondisi aerob (Howard dkk., 2003). Hal ini selanjutnya akan mempengaruhi proses degradasi untuk menghasilkan selulosa dan hemiselulosa. *P. chrysosporium* pada awalnya mendapatkan nutrisi dari media PDB, setelah dipindahkan nutrisi untuk pertumbuhan *P. chrysosporium* digantikan oleh bahan organik yang tersedia pada eceng gondok. kondisi menunjukkan adanya kerja mikroorganisme. *P. chrysosporium* dapat tumbuh dengan media eceng gondok dengan komponen yang terdapat di dalamnya, terutama ikatan senyawa lignin.

Aktifitas *P. chrysosporium* dalam *pretreatment* eceng gondok juga dipengaruhi oleh suhu. Inkubasi pada penelitian ini dilakukan pada suhu ruang yakni 27-30 °C. Pada banyak penelitian suhu 25 °C merupakan suhu optimum yang diperlukan untuk menghasilkan aktifitas LiP maksimum, dimana berhubungan dengan pertumbuhan fungi itu sendiri (Arora dan Gill, 2004). Hal ini disebabkan karena setiap fungi mempunyai suhu optimum, minimum dan maksimum yang berbeda untuk pertumbuhannya. Pertumbuhan pada suhu di bawah suhu optimum dapat menurunkan rata-rata metabolisme selnya. Sedangkan suhu di atas optimum, menyebabkan pertumbuhan menurun dan dimungkinkan terjadinya kematian jika melampaui suhu maksimumnya (Hossain, 2008). Berdasarkan penelitian kondisi optimum *pretreatment* kurang efektif disebabkan suhu yang lebih tinggi dibandingkan suhu tumbuh *P. chrysosporium*. Hal inilah yang menyebabkan persebaran pertumbuhan *P. chrysosporium* dalam media eceng gondok tidak merata. Kondisi ini juga menunjukkan kurangnya masa inkubasi untuk jamur memperbanyak sel dalam membentuk spora.

Setelah *pretreatment* secara biologis, *pretreatment* dilakukan lagi secara fisik dengan pemanasan selama 1 jam pada suhu 100° C. Pemanasan dengan suhu tinggi dapat menghancurkan lignin yang membungkus selulosa dan memperluas permukaan biomassa. Sehingga semakin banyak selulosa dan hemiselulosa yang larut dan mempermudah proses hidrolisis (Laser, 2002). Pada proses *pretreatment* dalam penelitian ini tidak dilakukan pengukuran kadar lignoselulosa namun berdasarkan analisis Idrees dkk, (2013) *pretreatment* dengan pemanasan dapat mempengaruhi proses *pretreatment*.

Setelah tahapan *pretreatment* dilakukan, sampel ditambahkan *T. viride* dan *A. niger* untuk proses hidrolisis. Pada tahapan ini kondisi substrat eceng gondok secara fisik lebih halus dari sebelumnya. Proses hidrolisis ini adalah tahapan degradasi oleh untuk mendegradasi komponen polisakarida menjadi komponen disakarida dan monosakarida.

Hidrolisis dilakukan secara biologis dengan memanfaatkan jamur *T. viride* dan *A. niger* yang dicampur dengan perbandingan 2:1. Tahap ini merupakan perlakuan untuk mendegradasi selulosa dan hemiselulosa yang berupa

rantai polisakarida menjadi komponen monosakarida. Pada tahapan ini kandungan lignoselulosa dan kadar gula reduksi diukur setelah proses hidrolisis. Pengukuran kadar lignoselulosa agar diketahui perbandingan kadar awal dan setelah proses degradasi oleh *P. chrysosporium*, *T. viride* dan *A. niger*. Tabel (4.2)

Tabel 4.2 Kadar Lignoselulosa Setelah Tahap Hidrolisis

Kadar Lignoselulosa (%)						
M.O		T. viride +A. niger				Kontrol
Substrat						
10 g	L	3,38	2,51	4,51	4,35	4,01
	S	9,60	7,82	13,35	8,05	13,64
	HS	10,11	10,88	15,08	16,13	18,96
20 g	L	2,53	4,63	4,30	4,19	3,92
	S	7,70	12,70	9,50	11,14	11,87
	HS	8,76	16,75	11,03	22,57	15,23

Keterangan : Lignin (L), Selulosa (S), Hemiselulosa (HS)

Hasil pengukuran menunjukkan adanya penurunan kadar lignoselulosa dalam setiap sampel dibandingkan dengan kadar awal sebelum pengolahan. Perlakuan yang sama pada semua sampel diberikan tidak seiring dengan kadar lignoselulosa yang dihasilkan. Kadar lignoselulosa setelah penambahan *T. viride* dan *A. niger* dengan konsentrasi yang sama pada seluruh sampel memiliki kadar yang berbeda pada setiap sampel. Kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa terendah secara berturut-turut sebesar 2,51%, 7,70% dan 8,76%.

Berdasarkan Tabel 4.1, kadar awal lignoselulosa lebih tinggi dibandingkan setelah dilakukan *pretreatment* dan hidrolisis. Hasil ini membuktikan terjadinya proses perombakan komponen lignoselulosa dengan penambahan mikroorganisme. Hasil pengukuran lignin setelah tahap hidrolisis menunjukkan proses biologis mampu mendegradasi lignin. Kandungan lignin turun mencapai <50%. Kadar awal lignin sebesar 6,87% sedangkan pada proses hidrolisis kadar lignin dari seluruh sampel antara 2,51% - 4,63%. Kandungan lignin yang masih tersisa juga menunjukkan bahwa proses degradasi belum sempurna karena *pretreatment* hanya dilakukan selama 10 hari. Penurunan tertinggi yakni sampel substrat 10 gram. Kadar lignin yang terukur adalah kadar

lignin yang tidak larut dalam asam, karena metode datta menunjukkan kadar lignin yang tidak terlarut dalam asam.

Penurunan kadar lignin disebabkan pada proses *pretreatment* oleh jamur *P. chrysosporium* yang mampu menghasilkan enzim seperti *lignin peroxidase* (LiP). Enzim ini mampu mengoksidasi senyawa fenolik yang terdapat pada lignin sehingga ikatannya akan rusak (Ramos dan Rojas, 2004). Menurut Hattaka (2001), enzim yang terlibat dalam degradasi lignin yakni LiP, MnP, Lacc, GLOZ, AAO, dan enzim yang memproduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. LiP mampu mengoksidasi cincin aromatik menjadi radikal kation. MnP berfungsi mengoksidasi Mn. Lacc mengoksidasi phenol menjadi radikal phenolic. GLOX mengoksidasi glyoxal menjadi asam glyoxilic yakni menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jamur *P. chrysosporium* akan membongkar rantai lignin yang cukup kompleks yang dapat menghalangi atau memperlambat akses enzim pada proses hidrolisis. Kemampuan jamur ini banyak digunakan untuk mendepolimerisasi substrat lignoselulosa tanpa banyak produk samping dan inhibitor (Chandel dkk., 2007; Samsuri dkk., 2007).

Pada tahap hidrolisis selulosa yang terdapat dalam eceng gondok dapat didegradasi oleh jamur *T. viride* dan *A. niger*. Berdasarkan pengukuran, kadar selulosa mengalami penurunan. Hal ini disebabkan adanya proses pemecahan komponen ikatan selulosa menjadi gula reduksi. Kapang *A. niger* telah diketahui mampu menghasilkan  $\beta$ -glukosidase yang tinggi. Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari pada selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis, dan mempunyai permukaan kontak antar molekul yang lebih luas dari selulosa (Kodri, 2013).

Pertumbuhan *A. niger* berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat. Molekul sederhana yang terdapat disekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstra seluler. Bahan organik dari substrat digunakan oleh

*A. niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel, dan mobilitas sel. *A. niger* selama proses perbanyakan dalam sel dalam media PDB berbentuk bulatan putih yang tersebar diseluruh media PDB. Pertumbuhan *T. viride* berbentuk bulatan putih seperti *P. chrysosporium*.



#### 4.4 Kadar Gula Reduksi Pada Tahap Hidrolisis

Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan terhadap semua sampel. Gula merupakan faktor penting bagi sel bakteri sebagai sumber energi (Kusumaningati, 2001). Tujuan pengukuran saat hidrolisis adalah untuk mengetahui kadar gula reduksi yang dihasilkan oleh Jamur *T. viride* dan *A. niger*. Sebelum melakukan pengukuran terhadap sampel, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi.

Hasil kalibrasi menggunakan gula anhidrat menunjukkan adanya regresi linier antara konsentrasi gula (mg/L) dan besaran nilai absorbansi. Konsentrasi gula anhidrat yang dikombinasikan mempengaruhi besar absorbansi dimana semakin banyak konsentrasi (mg/L) anhidrat maka semakin besar pula absorbansi. Regresi linier ini dengan persamaan yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi dari nilai absorbansi yang diukur menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm. Pengukuran pada panjang gelombang 540 nm karena penyerapan tertinggi terjadi pada gelombang ini (Narayanan, 2013). Kelemahan dari metode ini adalah bahan penyusun reagenya yang cenderung sulit didapat serta sampel yang diukur harus benar-benar dalam keadaan jernih. Oleh karena itu, jika sampel dalam kondisi keruh maka perlu adanya proses penjernihan terlebih dahulu. Proses penjernihan dilakukan menggunakan sentrifuge untuk 3000 rpm selama 20 menit untuk mengendapkan padatan dalam sampel. Sampel yang sudah diendapkan berwarna hijau tua karena dipengaruhi oleh warna substrat yang terdekomposisi. Pengukuran gula reduksi diperoleh setelah proses hidrolisis selama 72 jam (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Kadar Gula Reduksi Setelah Proses Hidrolisis

Kadar Gula Reduksi (mg/g)					
M.O	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>				Kontrol
Substrat					
10 Gram (1)	20,76	14,16	16,89	9,31	17,24
10 Gram (2)	10,19	10,90	9,22	12,57	15,57
20 Gram (1)	11,34	22,35	29,49	16,09	18,56
20 Gram (2)	14,77	11,34	20,94	25,79	13,72

Kadar gula reduksi yang diukur pada setiap reaktor memiliki kadar yang berbeda. Proses hidrolisis selama 72 jam menunjukkan adanya konsentrasi gula reduksi pada sampel. Setelah dilakukan pengukuran diperoleh kadar gula reduksi hasil hidrolisis pada rentang 9,22 mg/g - 29,49 mg/g. Pada proses ini variabel yang divariasikan hanya jumlah substrat yakni 10 gram dan 20 gram, sedangkan perlakuan konsentrasi penambahan *T. viride* dan *A. niger* adalah sama untuk reaktor fermentor dan kontrol. Hasil analisis yang diperoleh (Tabel 4.3) menunjukkan perbedaan kadar gula reduksi dikarenakan pengaruh *pretreatment* sebelum hidrolisis dalam memecah lignin sehingga komponen selulosa dan hemiselulosa dapat didegradasi oleh mikroorganisme selulolitik.

Pada umumnya tahapan *pretreatment* dilakukan dengan penambahan asam atau basa dan proses hidrolisis dengan proses asam atau secara enzimatik. Pemakaian agen biologis dalam tahap hidrolisis adalah agar hemat energi dan ramah lingkungan. Pada penelitian *pretreatment* dengan penambahan asam yang dilakukan oleh Awasthi (2013), konsentrasi gula reduksi optimum diperoleh sebesar 12,63 mg/g dengan proses penambahan 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Konsentrasi gula reduksi ini masih termasuk dalam rentang hasil penelitian yang diperoleh dengan perlakuan *pretreatment* secara biologis, dimana proses secara biologis memiliki hasil yang cukup baik dibandingkan secara kimia. Kelemahan dari proses ini hanya waktu yang dipakai untuk *pretreatment* cukup lama dibanding proses kimia dan enzimatik. Data hasil penelitian mengenai kadar gula reduksi pada bahan yang mengandung lignoselulosa relatif kecil. Pada penelitian ini kandungan gula reduksi per gram substrat hanya sebesar 0,009%-0,029%.

Holoselulosa dengan kandungan yang lebih banyak akan mudah dikonversi oleh *T. viride* dan *A. niger* menjadi gula reduksi. Pemakaian *A. niger* dalam hidrolisis berfungsi untuk membantu penurunan kandungan oksigen pada reaktor, dan kemampuannya menghasilkan enzim glukosa oksidasi. Hal ini disebabkan fermentasi baik dilakukan dalam kondisi anaerob (tanpa oksigen). Sedangkan *T. viride* karena jamur ini menghasilkan enzim selulase yang mampu menguraikan selulosa. Hubungan holoselulosa dengan kadar gula reduksi yang dihasilkan ditunjukkan dalam Gambar 4.1 untuk beberapa sampel.

Pembentukan gula reduksi pada saat hidrolisis dipengaruhi ketersediaan komponen lignoselulosa pada substrat. Lignoselulosa dengan konsentrasi yang kecil akan menghasilkan kadar gula reduksi yang kecil pula dibandingkan konsentrasi lignoselulosa yang lebih banyak. Komponen struktur selulosa dalam substrat eceng gondok yang telah dilakukan *pretreatment* dipecah oleh jamur hidrolisa. Polimer linier dari molekul D-glukosa yang merupakan ikatan bersama rantai  $\beta$ -1,4-glycosidic. Ikatan rantai selulosa dipecah menjadi komponen monosakarida berupa glukosa dan fruktosa. Selanjutnya monosakarida dapat dikonversi menjadi etanol dengan rantai karbon yang lebih sederhana pada tahap fermentasi. Kebanyakan polisakarida larut dalam air, namun selulosa tidak larut dalam air karena ikatan hidrogen intra dan intermolekular.

Pada komponen hemiselulosa, komponen penyusunnya merupakan komponen heteropolisakarida. Rantai cabang mengandung pentosa seperti D-xylosa dan L-arabinosa dan heksosa (D-mannosa, D-glukosa, dan D-galaktosa). Hemiselulosa tidak membentuk daerah kristalin sehingga lebih mudah dihidrolisis menjadi gula sederhana. Pada komponen lignoselulosa, hemiselulosa berikatan kovalen dengan lignin dan berikatan hidrogen dengan selulosa, sehingga hemiselulosa merupakan penghubung antara lignin dan selulosa (Gozan, 2014).

#### **4.5 Proses Fermentasi Menggunakan *S. cerevisiae* strain 08BET dan *Z. mobilis* Strain 08BET**

##### **1. Kadar Lignoselulosa Setelah Proses Fermentasi**

Kadar lignoselulosa pada tahap fermentasi diukur untuk mengetahui konsentrasi akhir lignoselulosa hasil seluruh proses SHF. Substrat yang telah mengalami proses *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi saat dianalisis secara fisik lebih lembut dibanding tahapan sebelumnya.

Pengukuran lignoselulosa pada tahap fermentasi menggambarkan adanya penurunan dibandingkan kadar lignoselulosa setelah hidrolisis (Tabel 4.4). Adanya penurunan kadar lignoselulosa terjadi karena pada tahap fermentasi selulosa dan hemiselosa masih terjadi proses perombakan menjadi gula reduksi. Berdasarkan data kadar gula reduksi (Tabel 4.4), penurunan kadar lignoselulosa diiringi dengan kenaikan kadar gula reduksi.

Tabel 4.4 Kadar Lignoselulosa Setelah Proses Fermentasi 72 Jam

Kadar Lignoselulosa (%)					
M.O	<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat	Inokulum 5%	Inokulum 10%	Inokulum 5%	Inokulum 10%	
10 g	L	3,23	2,43	3,94	3,74
	S	9,54	7,79	9,56	8,45
	HS	12,04	17,17	10,78	15,35
20 g	L	2,16	3,34	5,19	3,57
	S	7,44	9,64	7,43	9,43
	HS	13,63	11,83	12,22	11,54

Pada proses fermentasi dilakukan penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* sedangkan *T. viride* dan *A. niger* pada tahap ini masih aktif melakukan degradasi. Hal ini menyebabkan selulosa dan hemiselulosa yang ada pada substrat masih didegradasi menjadi gula reduksi. Demikian halnya dengan kadar lignin berdasarkan data awal sebesar 6,87%, setelah hidrolisis menjadi 3,375% dan setelah penambahan *S. cerevisiae* 5% semakin turun menjadi 3,23%. Konsentrasi komponen selulosa pada data awal sebesar 19,4% setelah hidrolisis turun menjadi 9,6% dan penambahan *S. cerevisiae* semakin turun menjadi 9,54%. Pada komponen hemiselulosa, konsentrasi awal sebesar 33,51% pada tahap setelah hidrolisis menjadi 10,108% dan pada tahap fermentasi naik menjadi 12,038%. Komponen hemiselulosa pada tahap hidrolisis mengalami penurunan dan setelah tahap fermentasi ini secara rata-rata mengalami kenaikan dibandingkan proses hidrolisis.

Penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* adalah untuk mengkonversi gula reduksi menjadi etanol. Kemampuan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* hanya terbatas pada kemampuannya mengkonversi komponen pentosa (glukosa dan fruktosa) menjadi etanol (wooley dkk., 1999). Monosakarida yang berupa pentosa ini adalah hasil dari pemecahan komponen selulosa. Pada hasil perombakan komponen hemiselulosa akan menghasilkan monosakarida berupa hexosa dan pentosa. Kadar gula reduksi juga dapat dihasilkan oleh degradasi lignin dalam proses delignifikasi (Nigam, 2002).

Pada fermentasi dalam penelitian komponen yang dihasilkan dari perombakan hemiselulosa tidak terkonversi menjadi etanol. *S. cerevisiae* selain mampu mengkonversi gula reduksi menjadi etanol, *yeast* ini juga mampu mendegradasi selulosa menjadi gula reduksi. Kondisi inilah yang menyebabkan pada tahap fermentasi dengan penambahan *S. cerevisiae* kadar selulosa dan lignin mengalami penurunan, sedangkan hemiselulosa rata-rata mengalami kenaikan karena tidak terkonversi menjadi gula reduksi namun masih diproduksi oleh *T. viride* dan *A. niger*. Penambahan *Z. mobilis* pada sampel, kadar hemiselulosa cenderung mengalami penurunan dibanding setelah perlakuan hidrolisis. Konsentrasi hemiselulosa setelah hidrolisis sebesar 15,075% setelah di analisis pada tahap fermentasi ke 72 jam konsentrasinya turun menjadi 10,78%.

## **2. Kadar Gula Reduksi Setelah Proses Fermentasi**

Hasil pengukuran terhadap kadar gula reduksi menunjukkan adanya kenaikan dan penurunan setelah proses fermentasi. Berdasarkan analisis menggunakan GC, terdapat hasil fermentasi selain etanol. Hal ini disebabkan proses fermentasi tidak hanya menghasilkan etanol. Hubungan kadar etanol dengan kadar gula reduksi tidak berbanding lurus (Tabel 4.5).

Kadar gula reduksi pada tahap fermentasi jam ke 48 substrat 10 gram memiliki kadar gula reduksi menunjukkan peningkatan dibandingkan setelah proses hidrolisis. Pada proses hidrolisis, *S. cerevisiae* inokulum 5% dengan substrat 10 gram kadar gula reduksi sebesar 20,746 mg/g, setelah proses fermentasi kadar gula reduksi meningkat menjadi 22,130 mg/g. Namun pada proses fermentasi jam ke 72 terjadi penurunan kadar gula reduksi menjadi 15,345 mg/g. Penurunan terjadi karena konversi gula reduksi menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* (Eshtiaghi dkk., 2012).

Tabel 4.5. Kadar Gula Reduksi Setelah Proses Fermentasi

Kadar Gula Reduksi (mg/g)						
M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat		Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	
48 Jam	10 g (1)	27,55	22,70	29,05	22,44	23,94
	10 g (2)	16,71	19,71	26,14	15,13	16,71
	20 g (1)	36,27	25,70	25,96	23,94	17,68
	20 g (2)	28,96	26,32	27,99	33,36	13,72
72 jam	10 g (1)	15,21	21,65	22,17	27,72	26,23
	10 g (2)	15,48	16,18	21,03	18,30	28,96
	20 g (1)	22,53	27,64	24,20	24,29	28,34
	20 g (2)	21,20	24,64	16,80	20,94	16,54

Berdasarkan hasil pengukuran keseluruhan kadar gula reduksi saat proses fermentasi mengalami kenaikan dari tahap hidrolisis. Penurunan terjadi setelah tahap fermentasi jam ke 72. Pada sampel penambahan *Z. mobilis* inokulum 10% dengan banyak substrat 10 g, terjadi peningkatan kadar gula reduksi pada jam ke 72, dari 18,781 mg/g menjadi 23,011 mg/g. Pada inokulum yang sama dan substrat 20 g, terjadi penurunan kadar gula reduksi pada jam ke 72, yakni 28,648 mg/g menjadi 22,614 mg/g.

Secara teoritis semakin banyak gula reduksi, maka semakin banyak pula etanol yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dengan hasil etanol yang kecenderungan mengalami penurunan pada jam ke 72, karena kadar gula reduksi rata-rata turun pada jam ke 72. Tetapi jika konsentrasi gula reduksi terlalu tinggi atau terlalu rendah akan berpengaruh terhadap kadar etanol. Jika konsentrasi gula reduksi terlalu pekat akan terjadi perbedaan tekanan osmosa yang besar antara lingkungan dan cairan sel sehingga metabolisme akan terhambat.

Hubungan antara kadar lignoselulosa dan kadar gula reduksi setelah fermentasi yang diperoleh berbanding lurus dengan kadar lignoselulosa yang tersedia. Tahap fermentasi ini kadar lignoselulosa dan gula reduksi semakin kecil. Semakin banyak selulosa yang tersedia semakin cepat waktu yang

dibutuhkan untuk hidrolisis dan semakin banyak pula gula yang dihasilkan untuk selanjutnya difermentasikan menjadi bioetanol. Selulosa dan hemiselulosa dengan kadar yang kecil memiliki kandungan kadar gula reduksi yang lebih banyak.

### **3. Pengukuran Kadar Etanol Saat Fermentasi**

Proses fermentasi SHF dilakukan untuk memudahkan pengontrolan terhadap tiap tahap, agar tercapai hasil yang diinginkan. Selain itu, interaksi antar dua tahap dapat diminimalkan. Proses fermentasi dilakukan selama 72 jam dengan waktu dua kali pengambilan sampel setelah penambahan *S. cerevisiae* dan penambahan *Z. mobilis*.

Pengambilan sampel pertama pada jam ke 48 masa inkubasi dan jam ke 72 pada reaktor yang sama. Sehingga diketahui kondisi optimum fermentasi. Sampel yang dimabil untuk analisis kadar etanol hanyalah bagian cairnya yang telah dihomogenkan dalam reaktor serta alat yang telah di sterilisasi untuk menghindari kontaminasi. Hal ini bertujuan agar pada tahap fermentasi pada 24 jam selanjutnya media fermentasi tidak terpengaruh dan tidak terkontaminasi oleh pengambilan sampel pada jam ke 48.

Berdasarkan Tabel 4.6 diperoleh konsentrasi etanol dalam setiap perlakuan memiliki konsentrasi yang berbeda pada jam ke 48 dan jam ke 72. Fermentasi substrat eceng gondok menggunakan mikroorganisme *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dilakukan dengan berbagai variasi konsentrasi (inokulum 5% dan 10%) serta variasi banyaknya substrat yang dimasukkan yakni 10 g dan 20 g. Pada fermentasi ini digunakan *khamir S. cerevisiae* yang diketahui mampu mengubah gula menjadi etanol. Penggunaan *Z. mobilis* digunakan karena mampu toleran terhadap suhu dan pH rendah. Penambahna *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* memiliki pengaruh yang berbeda pada hasil etanol yang diperoleh. Adapun hasil etanol dari masing-masing mikroorganisme sebagai berikut (Tabel 4.6 )

Tabel 4.6 Kadar Etanol Setelah Proses Fermentasi

		Kadar Etanol (mg/g)				
M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat		Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	
48 Jam	10 Gram (1)	0,661	1,118	0,453	0,129	0,000
	10 Gram (2)	0,839	1,195	0,834	0,129	0,000
	20 Gram (1)	0,077	0,177	0,066	0,094	0,000
	20 Gram (2)	0,048	0,088	0,160	0,059	0,000
72 Jam	10 Gram (1)	0,190	0,453	0,118	0,132	0,000
	10 Gram (2)	0,319	0,464	0,096	0,177	0,000
	20 Gram (1)	0,070	0,104	0,054	0,082	0,000
	20 Gram (2)	0,000	0,084	0,075	0,000	0,000

Kadar etanol yang dihasilkan antara 0 – 1,195 mg/g variasi inokulum jumlah substrat dan lama inkubasi mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 4.6, kadar etanol maksimum dari dua jenis mikroorganisme yang berbeda diperoleh pada penambahan *S. cerevisiae* inokulum 10% (v/v) selama 48 jam, substrat 10 gram sebesar 1,118 mg/g dan 1,195 mg/g. Hasil ini tidak jauh berbeda sesuai dengan penelitian Mishima (2008) kadar etanol yang dihasilkan sebesar 0,14 g/g dengan penambahan *S. cerevisiae* NBRC 2346 menggunakan proses SSF. Selain itu penelitian dengan Merina dan Trihadiningrum (2011) yang menyebutkan kadar etanol tertinggi sebesar 0,27% selama tiga hari dan pada waktu setelahnya terjadi penurunan kadar etanol. Hal ini juga berbeda pada penelitian yang dilakukan Esthiagi dkk. (2012) menyebutkan persentase kadar etanol meningkat pada jam ke 72 dengan proses *pretreatment* menggunakan asam dan enzim.

Pada saat peremajaan dalam media YMB, *S. cerevisiae* mengalami perbanyakan jumlah sel, ketika dimasukkan ke dalam media eceng gondok akan mengalami masa adaptasi. Pada jam ke 48 diketahui *S. cerevisiae* menghasilkan etanol dengan kadar lebih banyak untuk penambahan konsentrasi yang lebih besar. Hal ini menunjukkan semakin banyak penambahan *S. cerevisiae* maka semakin banyak aktifitas degradasi monosakarida dan disakarida menjadi etanol. Setelah pengambilan sampel



pada jam ke 72 diperoleh kadar etanol yang lebih sedikit dengan hasil yang signifikan. Pada kondisi ini *S. cerevisiae* pembelahan sel sebanding dengan kematian sel yakni fase stasioner. Hal ini menyebabkan degradasi untuk menghasilkan etanol juga semakin sedikit.

Pembentukan etanol dalam proses ini menggunakan reaktor yang masih terdapat udara, namun selama proses reaktor dikondisikan agar tidak tersuplai oksigen. Pada fermentasi eceng gondok ini proses terjadi dengan kondisi aerob kemudian dilanjutkan dengan kondisi anaerob karena reaktor yang ditutup rapat. Jika kondisi anaerob dimulai terlalu dini maka sel yang ada tidak cukup banyak untuk melakukan fermentasi secara baik. Kondisi anaerob inilah terjadinya reaksi pembentukan etanol. Mikroorganisme melakukan perombakan glukosa menjadi etanol dan gas CO<sub>2</sub>.

Hasil penelitian secara keseluruhan secara umum terjadi penurunan kadar etanol setelah fermentasi jam ke 72. Kondisi ini disebabkan karena semakin lama waktu fermentasi kadar etanol yang telah terbentuk dapat dikonversi menjadi komponen lain. Pada dasarnya Etanol adalah hasil utama fermentasi dari *S. cerevisiae* namun di samping itu dapat terbentuk asam laktat, asetaldehid, gliserol dan asam asetat.

Pertumbuhan *S. cerevisiae* dipengaruhi oleh adanya penambahan nutrisi yaitu unsur C sebagai sumber carbon, unsur N serta suhu optimum untuk fermentasi antara 28 – 30 °C. Sedangkan pada penelitian ini suhu fermentasi merupakan kondisi suhu ruang >30 °C. Sehingga optimasi fermentasi tidak maksimal. Kandungan nutrisi yang semakin kecil dapat menjadikan pertumbuhan mikroorganisme terhambat. Kandungan gula reduksi sebagai komponen monosakarida yang berfungsi sebagai nutrisi *S. cerevisiae* yang semakin kecil juga akan mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan. Kadar Gula reduksi saat fermentasi telah dianalisis dengan hasil yang lebih kecil dibandingkan sebelum tahap fermentasi dilakukan (Tabel 4.6)

Kadar etanol pada reaktor yang ditambahkan *Z. mobilis* konsentrasi 5% dan 10% tidak jauh berbeda dengan *S. cerevisiae* baik pada jam ke 48 dan jam ke 72. *Trend* data yang terbentuk kadar etanol menurun pada pengambilan tahap ke dua pada jam ke 72. Kadar etanol tertinggi dengan

penambahan *Z. mobilis* sebesar 0,834 mg/g dengan konsentrasi inokulum 5% dengan substrat 10 gram pada jam ke 48. Penurunan terjadi setelah hari kedua menjadi 0,096 mg/g. Hal ini karena kemampuan sel-sel *Z. mobilis* dibatasi oleh toleransi terhadap etanol. Ketika batas etanol telah memenuhi maka pertumbuhan *Z. mobilis* akan terhambat sehingga sel *Z. mobilis* akan mati. Selain itu adanya penurunan terjadi akibat adanya konversi hasil fermentasi menjadi asam asetat dan adanya pengaruh inhibitor (Li dkk., 2007; Widjaja dkk., 2010). Pada reaktor yang menjadi kontrol tanpa penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* tidak terdapat kadar etanol sehingga. Hal ini menjadi acuan bahwa adanya penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* mampu mengkonversi gula reduksi menjadi etanol.

Proses fermentasi oleh *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* ini terjadinya degradasi komponen monosakarida berupa komponen hexosa menjadi komponen yang lebih sederhana lagi. Komponen hexosa ini merupakan hasil degradasi selulosa dengan komponen rantai karbon yang kompleks. Hexosa yang memiliki rantai karbon enam dengan rumus empiris  $C_6H_{12}O_6$  dipecah oleh mikroorganisme menjadi  $C_2H_5OH$ . Pada hasil yang telah diperoleh, perbandingan kadar etanol dari substrat 10 gram dan 20 gram menunjukkan hasil etanol lebih besar pada substrat yang lebih sedikit. Kadar maksimum untuk substrat 20 gram hanya sebesar 0,31 mg/g dengan penambahan *Z. mobilis* 5% selama 48 jam.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi fermentasi diantaranya adalah suhu, pH media fermentasi, kultur inokulum yang digunakan, waktu fermentasi, jumlah nutrien, konsentrasi media, gula reduksi dsb (Kusumaningati, 2001; Wignyanto, 2001). Konsentrasi etanol yang didapatkan pada penelitian ini dapat dikatakan kecil jika dibandingkan dengan penelitian fermentasi dengan proses *pretreatment* dan hidrolisis dengan penambahan asam atau basa. Hal ini karena tahap *pretreatment* dan hidrolisis hanya memanfaatkan peran serta agen biologis dalam prosesnya. Pengukuran pH yang dilakukan menunjukkan nilai pH relatif konstan. pH awal sebelum fermentasi bernilai 7, pada tahap fermentasi hasil pengukuran tidak menunjukkan adanya perubahan nilai pH.

Besarnya kadar etanol dipengaruhi oleh kadar gula reduksi yang tersedia sebagai bahan pembentukan etanol dan kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasinya. Kadar etanol yang tinggi diiringi oleh penurunan kadar gula reduksi. Hasil serupa disampaikan oleh Nigam (2002) pada penelitiannya dalam konversi hemiselulosa menjadi etanol, kadar gula reduksi yang semakin turun berbanding terbalik dengan kadar etanol yang diperoleh yakni semakin besar. Besarnya kadar etanol dengan penambahan *S. cerevisiae* seiring dengan penurunan gula reduksi sedangkan pada penambahan *Z. mobilis* kadar etanol yang lebih tinggi diikuti kadar gula reduksi yang juga tinggi. Hal ini disebabkan pada reaktor *Z. mobilis* gula reduksi yang terukur juga terdapat gula pentosa yang lebih banyak berupa xylosa hasil dari degradasi hemiselulosa

Berdasarkan hubungan konsentrasi etanol dan kadar gula dari data penelitian, kemampuan mikroorganisme dalam mengkonversi gula reduksi menjadi etanol berbeda-beda. Konsentrasi etanol salah satunya tergantung dengan kerja bakteri *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dalam mengkonversi gula reduksi. Namun konsentrasi etanol tidak dapat ditentukan hanya dengan konsentrasi gula reduksi karena proses fermentasi dapat dipengaruhi oleh banyak faktor. Proses SHF ini memiliki beberapa kelemahan, diantaranya adalah kinerja  $\alpha$ -amilase yang tidak optimal akibat terjadinya inhibisi enzim oleh akumulasi gula meskipun kandungan  $\alpha$ -amilase dalam sistem tinggi.  $\alpha$ -amilase merupakan enzim dari proses hidrolisis yang mampu memecah pati menjadi komponen-komponen yang lebih kecil. Jika  $\alpha$ -amilase terinhibisi maka proses liquifikasi akan terhenti meskipun belum semua pati yang tersedia diubah menjadi gula sederhana (Neves, 2006). Inhibisi tersebut pada akhirnya akan mempengaruhi etanol yang dihasilkan. Berdasarkan analisis data antara penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*, diketahui khamir *S. cerevisiae* menunjukkan hasil yang lebih besar dibandingkan bakteri *Z. mobilis*.

#### 4.6 Analisis Menggunakan Metode *Respon Surface* (Minitab 16)

Hasil analisa data *respon surface* digunakan untuk mengetahui titik optimum kadar etanol yang dihasilkan dari data penelitian peran antara mikroorganisme bakteri *Z. mobilis* dan khamir *S. cereviceae* serta konsentrasinya. Uji ini dilakukan dengan membandingkan hubungan faktor dari variabel yang telah ditentukan dari penelitian ini yang meliputi jenis mikroorganisme, konsentrasi, waktu, dan jumlah substrat (Lampiran 3). *Response Surface Method* (RSM) menampilkan pemodelan antara beberapa *explanatory variable* dengan satu atau lebih *response variable*. Tujuannya adalah menentukan titik optimal pada response variable yang bersesuaian dengan setting level pada variabel-variabel *explanatory*-nya.

Analisis kadar etanol optimum dengan variabel inokulum (konsentrasi), waktu dan jumlah substrat dilakukan plot masing-masing. Hasil analisis konsentrasi mikroorganisme dengan waktu fermentasi diketahui bahwa semakin banyak penambahan mikroorganisme maka etanol yang dihasilkan akan semakin besar. Kadar etanol yang optimum akan diperoleh pada saat fermentasi *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dilakukan selama 48 jam, setelah itu kadar etanol akan mengalami penurunan hal ini sesuai dengan data hasil penelitian bahwa pada jam ke 72 terdapat penurunan kadar etanol. Media fermentasi berupa susbtat eceng gondok yang dimasukkan adalah 10 gram dan 20 gram. Hal ini menunjukkan kondisi suatu media fermentasi, untuk media 10 gram kondisi air lebih banyak dibandingkan media 20 gram. hasil analisis menunjukkan kadar etanol optimum akan didapatkan jika media fermentasi adalah 10 gram.

Berdasarkan analisis *surface plot* yang dihasilkan antara mikroorganisme dengan jumlah konsentrasi, diperoleh nilai optimum etanol adalah dengan penambahan *S. cerevisiae* dengan konsentrasi 10%. Hal ini sesuai dengan data secara obyektif bahwa *S. cerevisiae* memiliki nilai tertinggi untuk menghasilkan kadar etanol. Pada plot antara mikroorganisme dan waktu fermentasi, nilai optimum kadar etanol diperoleh jika *S. cerevisiae* diinkubasi dalam media fermentasi selama 48 jam. Apabila dilakukan

penambahan waktu maka kadar etanol yang dihasilkan justru akan turun sehingga tidak efektif dalam proses hasil fermentasi. Substrat kering eceng gondok sebagai media fermentasi yang di masukkan menunjukkan bahwa kondisi *S. cerevisiae* untuk menghasilkan etanol optimum yakni pada substrat 10 gram yakni media fermentasi yang memiliki kandungan air lebih banyak.

Analisis menggunakan respon surface ini dilakukan terhadap hubungan dua variabel penelitian. Masing-masing hubungan antara dua variabel yang telah di plotkan diketahui bahwa tidak semua variabel berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Pada analisis ini hubungan konsentrasi dengan beberapa variabel lainnya tidak memiliki pengaruh. Hal inipun dapat sesuai dengan data hasil penelitian yang menunjukkan kadar etanol dengan penambahan mikroorganisme sebanyak 5% dan 10% secara rata-rata memiliki perbedaan yang tidak jauh dibandingkan dengan hubungan variabel lainnya.

Berdasarkan analisis pada penjelasan sebelumnya, maka mikroorganisme yang memiliki nilai optimum adalah jamur *S. cerevisiae* jika dibandingkan dengan bakteri *Z. mobilis*. Konsentrasi inokulan yang paling optimum adalah pada saat 10% daripada 5%. Substrat yang paling optimum adalah pada kadar 10 gram dibandingkan pada kadar 20 gram dan waktu fermentasi yang paling optimum yaitu ketika 48 jam.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Penelitian terhadap fermentasi substrat eceng gondok telah dilakukan dengan hasil yang diperoleh, sehingga dapat disimpulkan bahwa:

1. Perbandingan kadar etanol yang lebih besar diperoleh dengan penambahan *S. cerevisiae* dibandingkan *Z. mobilis*. Kadar maksimum penambahan *S. cerevisiae* sebesar 1,195 mg/g dengan substrat 10 gram selama 48 jam sedangkan *Z. mobilis* sebesar 0,834 mg/g
2. Konsentrasi penambahan *S. cerevisiae* inokulum 10% diketahui memiliki kadar etanol lebih besar dibandingkan penambahan inokulum 5% yakni sebesar 1,195 mg/g dbandingkan 0,839 mg/g.

#### **5.2 Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan sebagai berikut:

1. Penelitian ini dapat dikembangkan dengan proses pretreatment fisik dengan suhu yang lebih optimum.
2. Penelitian ini juga dapat dikembangkan menggunakan proses biologis dengan variasi *strain* mikroorganisme untuk memperoleh kondisi optimum *pretreatment*.
3. Perlu adanya penelitian lanjutan untuk kombinasi proses *pretreatment* biologis dan fisik serta variasi mikroorganisme lain untuk fermentasi metode SHF.

## Lampiran 1

### Alat, Bahan dan Prosedur Pengukuran

#### a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

- |                                     |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 1. Labu erlenmeyer 250 mL           | 14. Water bath             |
| 2. Gelas beaker 250 mL              | 15. Botol reaktor 250 mL   |
| 3. Gelas beaker 1000 mL             | 16. Botol reaktor 500 mL   |
| 4. Botol reaksi 250 mL              | 17. Botol sampel 5 mL      |
| 5. Botol reaksi 140 mL              | 18. Neraca analitik AA-200 |
| 6. Thermometer batang               | 19. Pipet volum            |
| 7. Autoclave                        | 20. Pipet tetes            |
| 8. Oven                             | 21. Inkubator              |
| 9. Furnace                          | 22. Bunsen                 |
| 10. Desikator                       | 23. Tabung reaksi          |
| 11. Shaker Innova 2000              | 24. Jarum ohse             |
| 12. Sentrifuge Jouan E82            | 25. Cawan petri            |
| 13. UU- spektrofotometer Genesys 20 | 26. Alumunium foil         |

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah:

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 1. Daun dan batang eceng gondok     | 13. Kapas lemak                        |
| 2. Inokulum <i>P. chrysosporium</i> | 14. <i>Natrium arsenat</i>             |
| 3. Inokulum <i>T. viride</i>        | 15. pH indikator                       |
| 4. Inokulum <i>A. niger</i>         | 16. <i>wrapping plastic</i>            |
| 5. Inokulum <i>Z. mobilis</i>       | 17. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 72% |
| 6. Inokulum <i>S. cereviceae</i>    | 18. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 N |
| 7. Akuades                          |  |
| 8. Reagent Arsenomolybdate          |  |
| 9. Reagent Nelson                   |  |
| 10. <i>Potato dextrose agar</i>     |  |
| 11. <i>Potato dextrose broth</i>    |  |
| 12. <i>Yeast Malt Broth</i>         |  |

## **b. Prosedur Kerja**

Persiapan substrat eceng gondok

1. Eceng gondok dipisahkan antara batang, daun dan akar
2. Dicuci menggunakan air bersih kemudian direndam selama  $\pm 2$  jam
3. Batang dicacah ukuran 0,5 cm
4. Daun dicacah ukuran 4 cm
5. Dikeringkan diatas sinar matahari selama 1 minggu hingga kecoklatan dan kadar airnya konstan
6. Digerus kasar (tanpa di saring)
7. Disimpan ditempat kering agar tidak lembap.

## **c. Prosedur Analisis Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin Metode Datta (Chesson,1981)**

1. 1-2 gram sampel (berat a) dicampur dengan 150 mL aquades.
2. Sampel dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam.
3. Sampel disaring dengan kertas saring kemudian dibilas dengan aquades
4. Bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  sampai konstan dan ditimbang beratnya (berat b)
5. Sampel yang sudah dikeringkan sebelumnya dicampur dengan 150 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N, dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam.
6. Sampel kemudian diberiperlakukan seperti langkah (3) dan (4) lalu ditimbang beratnya (berat c)
7. Sampel hasil langkah (6) kemudian dicampur dengan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% sebanyak 10 mL
8. Dilakukan perendaman terhadap sampel selama 4 jam
9. Sampel dicampur dengan 150 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N.
10. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam
11. Sampel kemudian disaring dengan kertas saring lalu dibilas dengan aquades.
12. Bagian padat sampel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  sampai konstan dan dihitung beratnya. (berat d)
13. Sampel hasil langkah (12) dipanaskan pada suhu  $600^{\circ}\text{C}$  selama 4-6 jam lalu ditimbang (berat e)



Cara perhitungan kadar hemiselulosa, selulosa dan kadar lignin menggunakan rumus berikut.

$$\text{Kadar hemiselulosa} = \frac{\text{berat } b - \text{berat } c}{\text{berat } a} \times 100\%$$

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{\text{berat } c - \text{berat } d}{\text{berat } a} \times 100\%$$

$$\text{Kadar lignin} = \frac{\text{berat } d - \text{berat } e}{\text{berat } a} \times 100\%$$

Perhitungan Pengenceran Asam Sulfat Pekat 72 % dan 1 N

Perhitungan pengenceran asam sulfat pekat 72% dalam 100 ml aquadest

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 98\% \times V_1 &= 0,72 \times 100 \text{ ml} \\ 0,98 \times V_1 &= 72 \\ V_1 &= 72 / 0,98 \\ &= 73,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jumlah asam sulfat pekat yang di pipet = 73,5 ml

Jumlah asam aquadest yang dibutuhkan = 26,5 ml

Perhitungan pengenceran asam sulfat pekat 72% dalam 100 ml aquadest

$$\text{Normalitas} = \frac{0,98 \times 1000 \times 1,8}{98/2} = 36,8 \text{ N}$$

Perhitungan pengenceran asam sulfat pekat 1 N

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 36 \times V_1 &= 1 \times 100 \\ 0,98 \times V_1 &= 100 \\ 0,98V_1 &= 100 \\ V_1 &= 2,7 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jumlah asam sulfat pekat yang di pipet = 2,7 ml

Jumlah aquadest yang dibutuhkan = 26,5 ml

#### d. Analisa Suhu

1. Persiapan thermometer batang
2. thermometer batang dimasukkan kedalam sampel yang ingin diukur
3. pengamatan suhu.

**e. Analisa pH**

1. Kertas pH indikator disiapkan
2. Dichelupkan ke dalam reaktor
3. Dibandingkan warna sesuai dengan ketentuan pada label.

**f. Perhitungan Gula Reduksi**

Proses analisa gula reduksi menggunakan metode Nelson Somogyi:

Langkah-langkah yang dilakukan dalam menganalisa kadar glukosa adalah sebagai berikut :

1. Membuat kurva standar kalibrasi untuk analisa glukosa
  - Melarutkan 10 mg glukosa anhidrat kedalam 100 ml aquades
  - Mengencerkan larutan glukosa standar sehingga diperoleh konsentrasi 2,4,6,8 dan 10 mg/100 ml.
  - Menyiapkan 7 tabung reaksi bersih yang diisi dengan 1 ml larutan glukosa standar dengan konsentrasi berbeda.
  - Mengisi setiap tabung dengan 1 ml aquades sebagai blanko
  - Menambahkan pada masing-masing tabung 1 ml reagen Nelson kemudian memanaskan tabung reaksi kedalam penangas air mendidih selama 20 menit
  - Mengambil semua tabung dan mendinginkan secara bersama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C.
  - Menambahkan 1 mL reagen Arsenomolydate.
  - Mengaduk hingga semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  yang ada larut kembali.
  - Menambahkan 7 ml aquades lalu diaduk hingga rata.
  - Membaca dan mentera optical density (OD) masing-masing larutan dengan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm.
  - Membuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan OD.
  - Menganalisis dengan regresi linier.
2. Melakukan analisis kadar glukosa
  - Mengambil 1 ml larutan pada sampel yang diuji
  - Menambahkan 1 ml reagen nelson

- Memanaskan tabung reaksi kedalam penangas air mendidih selama 20 menit
- Mendinginkan sehingga suhu mencapai 25°C.
- Menambahkan 1 ml reagen arsenomolybdate
- Mengaduk hingga semua endapan terlarut
- Menambahkan 7 ml aquades dan diaduk hingga rata
- Membaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm
- Memasukkan nilai absorban pada pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm

Fungsi adanya reagen Nelson ini yaitu untuk mereduksi kupri oksida menjadi kupro oksida yang mana K-Na-tartrat yang ada dalam reagen Nelson berfungsi untuk mencegah terjadinya pengendapan kupri oksida sehingga nantinya kupri oksida bisa direduksi menjadi kupro oksida

Pemanasan dalam air yang mendidih selama 20 menit. Hal ini bertujuan untuk mempercepat proses reduksi kupri oksida menjadi kupro oksida. Lalu larutan didinginkan supaya reaksi berjalan stabil karena jika terlalu panas kemungkinan akan ada komponen senyawa yang rusak atau habis karena menguap. Larutan berubah warna menjadi hijau setelah proses pemanasan tersebut. Setelah didinginkan maka larutan ditambahkan dengan reagen arsenomolybdat yang berwarna kuning kehijauan sebanyak 1mL. Penambahan larutan arsenomolybdat ini bertujuan agar bisa bereaksi dengan endapan kupro oksida. Pada peristiwa ini kupro oksida akan mereduksi kembali arsenomolybdat menjadi molibdene blue yang berwarna biru, warna biru inilah yang nantinya akan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer. Lalu ditambahkan dengan aquadest hingga 10 mL agar larutan tidak terlalu pekat dan dapat terbaca saat dilakukan pembacaan absorbansi. Setelah itu larutan dikocok agar larutan tercampur secara merata dan homogen.

Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 540 nm karena pada panjang gelombang ini molekul glukosa dapat menyerap sinar secara optimum sehingga pembacaan absorbansi dapat berjalan dengan baik.

3. Komposisi Reagen Arsenomolybdat, Nelson-Somogyi dan Pembuatannya 3.a.

3. a. Reagen Arsenomolybdat

- Reagen A : 25 g Ammonium molybdat, 450 mL akuades, 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat
- Reagen B : 3 g Natrium arsenat, 25 mL akuades, Reagen A

3.b. Reagen Nelson

- Nelson A : 12,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat, 12,5 g KNa tartrat, 10 g  $\text{NaHCO}_3$ , 100 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, 500 mL akuades
- Nelson B : 7,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mL akuades, 1-2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat

4. Pembuatan Reagen Arsenomolybdat

4.a. Reagen A

- Ammonium molybdat ditambah akuades, diaduk hingga tidak ada endapan.
- Larutan ditambah  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan kembali diaduk hingga rata.

4.b. Reagen B

- Natrium arsenat ditambah akuades, diaduk hingga tidak ada endapan.
- Larutan ditambah reagen A dan kembali diaduk hingga rata.
- Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama  $\pm 24$  jam.

5. Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi

Reagen Nelson terdiri atas Nelson A dan Nelson B dengan perbandingan masing-masing 25:1. Reagen Nelson harus baru setiap kali pengujian sampel.

5.a. Nelson A

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat, KNa tartrat,  $\text{NaHCO}_3$ , dan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dicampur dan ditambah 350 mL akuades.
- Larutan diaduk hingga tidak ada endapan, kemudian diencerkan dengan menambah akuades sampai larutan menjadi 500 mL.

5.b. Nelson B

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam akuades.
- Larutan diaduk hingga tidak ada endapan (dihomogenkan), kemudian ditambahkan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

**g. Analisis N-Organik (Metode Kjeldahl)**

Peralatan dan bahan

- |   |  |
|---|--|
| 1. Timbangan analitis                   | 9. Larutan brucin asetat 0,5%                    |
| 2. Labu Kjeldahl                        | 10. Larutan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat |
| 3. Pipet 10 mL                          | 11. Gelas Ukur                                   |
| 4. Labu volumetric                      | 12. Erlenmeyer 125 mL                            |
| 5. Buret                                | 13. Tablet Kjeldahl                              |
| 6. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat | 14. Akuades                                      |
| 7. NaOH 40%.                            | 15. Borak petunjuk                               |
| 8. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N |  |

Prosedur kerja analisis:

- 1) Timbang 0,1 g sampel dengan timbangan analitis.
- 2) Masukkan kedalam labu ukur.
- 3) Tambahkan tablet Kjeldahl 1 g dan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, *shake* agar tercampur.
- 4) Lakukan destruksi. Destruksi telah sempurna bila cairan terlihat jernih.
- 5) Dinginkan hasil destruksi. Kemudian encerkan dengan aquadest menjadi 100 mL, setelah itu pipet 10 mL cairan destruksi kedalam labu Kjeldahl.
- 6) Tambahkan 50 mL aquadest dan 20 mL NaOH 40%, segera pasang pada alat Kjeldahl.
- 7) Disiapkan 20 mL asam borak petunjuk dalam 125 mL Erlenmeyer menampung hasil destilasi. Lakukan destilasi selama 10 menit setelah tetesan pertama jatuh (hasil destilasi menjadi 50 mL) hasil berwarna hijau.
- 8) Titrasi hasil destilasi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N sampai terjadi perubahan warna dari hijau menjadi merah anggur atau ungu.
- 9) Lakukan prosedur 1-8 untuk blanko.
- 10) Hitung kadar N-Total (%) dengan rumus:

*Kadar N – Total (%)*

$$= \frac{(mL \text{ hasil titrasi sampel} - mL \text{ hasil titrasi blangko})}{g \text{ sampel}} \times 14 \times 0,01 \frac{g}{mL} \times fk$$

$$fk = \frac{kadar \text{ air} + 100}{100}$$

#### h. Analisis C-organik (Metode Gravimetri)

Peralatan dan bahan:

1. Neraca analitis
2. Cawan porselen
3. Desikator
4. Oven 70-105°C
5. Furnace 550°C

Prosedur kerja analisis:

1. Timbang cawan porselen yang akan digunakan dengan neraca analitis.
2. Timbang sampel yang telah dipanaskan dalam oven sebelumnya selama 24 jam pada suhu 70°C.
3. Masukkan kedalam *furnace* 550°C selama 1 jam.
4. Masukkan kedalam oven selama 1 jam.
5. Masukkan ke dalam desikator selama 30 menit.
6. Timbang cawan porselen berisi sampel abu dengan neraca analitis.
7. Hitung kadar *volatile solid* (VS) dengan rumus:

$$Vs = \frac{(b - a) - (c - a)}{(b - a)} \times 100\%$$

Dimana:      a = cawan kosong (g)  
                  b = cawan + sampel kering (g)  
                  c = cawan + sampel abu (gr)

8. Hitung dan catat kadar C-organik dengan rumus:  $C = Vs \times 0,58$

#### i. Analisis Phospor

Alat dan Bahan

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. Timbangan analitis   | 7. Aquadest           |
| 2. Erlenmeyer 125 mL  | 8) PP                 |
| 3. Pipet 10 mL  | 9. NaOH               |
| 4. Labu volumetric  | 10. Amonium molybdate |
| 5. Sulfat asam nitrat   | 11. SnCl <sub>2</sub> |
| 6. Kalsium ferosulfat (K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) |                       |

Cara Kerja:

1. Timbang 0,1 g sampel dengan timbangan analitis.
2. Masukkan ke dalam Erlenmeyer.
3. Destruksi dengan sulfat asam nitrat dan kalium ferosulfat masing-masing 1 mL.
4. Menambahkan aquadest sampai dengan 25 mL. Diamkan 1 malam.
5. Destruksi sampai dengan hampir kering.
6. Dinginkan hasil destruksi. Ditambahkan PP dan NaOH sampai merah.
7. Mengencerkan dengan aquadest sampai dengan 25 mL
8. Amonium Molybdate 1 mL ditambahkan.
9. 3 tetes  $\text{SnCl}_2$  sampai berubah biru.
10. Diamkan selama 10 menit sampai jadi biru
11. Analisis menggunakan spektrofotometer, 650 nm.

#### **j. Perhitungan Kadar Etanol Menggunakan Metode GC**

Perhitungan kadar etanol menggunakan metode (GC) *Gas Chromatography* Hewlett Packard (HP-series 6890) Made in USA, yang dilakukan di Laboratorium Jurusan Teknik Kimia UBAYA. Metode/kondisi operasi alat GC untuk analisa Ethanol/alkohol, biasanya hanya diperlukan informasi suhu oven, *rate carrier gas*, kolom yang dipakai, kondisi detektor, jenis detektor, suhu dan semua aturan yang mendukung kondisi operasi alat.

Contoh kondisi operasi dalam jurnal :

Merk	: Hewlett Packard (HP-series 6890) Made in USA
Kolom	: HP-Poraplot -Q04
Type	: Mid Polar
Detektor	: FID (Flame Ionisasi Detector)
Suhu Kolom	: 150 C
Suhu Injektor	: 250 C
Suhu Detektor	: 275 C
RT ( <i>Retention Time</i> )	: 1.9 menit
Flow Rate	: 2 ml/menit
Average Velocity	: 23cm/s

## Lampiran 2

### Data Hasil Penelitian

#### 1. Reaktor

Waktu	Substrat (gram)	<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		
		7,5 % (v/v)	10 % (v/v)	7,5 % (v/v)	10 % (v/v)	
48 jam	10	$R_1 = y_{11111}$	$R_5 = y_{12111}$	$R_9 = y_{21111}$	$R_{13} = y_{22111}$	$R_{17} = \text{Kontrol 1}$
		$R_2 = y_{11112}$	$R_6 = y_{12112}$	$R_{10} = y_{21112}$	$R_{14} = y_{22112}$	$R_{18} = \text{Kontrol 2}$
	20	$R_3 = y_{11121}$	$R_7 = y_{12121}$	$R_{11} = y_{21121}$	$R_{15} = y_{22121}$	$R_{19} = \text{Kontrol 3}$
		$R_4 = y_{11122}$	$R_8 = y_{12122}$	$R_{12} = y_{21122}$	$R_{16} = y_{22122}$	$R_{20} = \text{Kontrol 4}$
72 jam	10	$R_1 = y_{11211}$	$R_5 = y_{12211}$	$R_9 = y_{21211}$	$R_{13} = y_{22211}$	$R_{17} = \text{Kontrol 1}$
		$R_2 = y_{11212}$	$R_6 = y_{12212}$	$R_{10} = y_{21212}$	$R_{14} = y_{22212}$	$R_{18} = \text{Kontrol 2}$
	20	$R_3 = y_{11221}$	$R_7 = y_{12221}$	$R_{11} = y_{21221}$	$R_{15} = y_{22221}$	$R_{19} = \text{Kontrol 3}$
		$R_4 = y_{11222}$	$R_8 = y_{12222}$	$R_{12} = y_{21222}$	$R_{16} = y_{22222}$	$R_{20} = \text{Kontrol 4}$

#### 2. Analisa Lignoselulosa Awal

Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
33,51	19,4	6,87

#### 3. Analisa Lignoselulosa Setelah Hidrolisis

M.O		Hidrolisis 7							Kontrol				
		<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>				<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>							
Substrat		Lignin	Selulosa	HS	Lignin	Selulosa	HS	Lignin	Selulosa	HS			
	10 gram	R <sub>1</sub> =	3,38	9,60	10,11	R <sub>5</sub> =	2,51	7,82	10,88	R <sub>17</sub> =	4,01	13,64	18,96
	20 gram	R <sub>3</sub> =	2,53	7,70	8,76	R <sub>7</sub> =	4,63	12,70	16,75	R <sub>19</sub> =	3,92	11,87	15,23
	10 gram	R <sub>9</sub> =	4,51	13,35	15,08	R <sub>13</sub> =	4,35	8,05	16,13	R <sub>17</sub> =	4,01	13,64	18,96
	20 gram	R <sub>11</sub> =	4,30	9,50	11,03	R <sub>15</sub> =	4,19	11,14	22,57	R <sub>19</sub> =	3,92	11,87	15,23

Keterangan, HS : Hemiselulosa

#### 4. Analisa Lignoselulosa Setelah Fermentasi

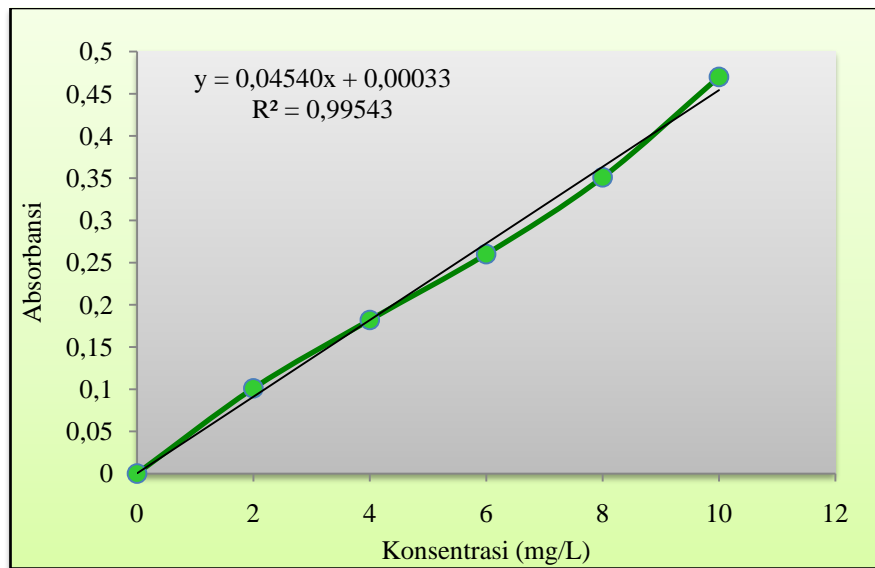
M.O		Fermentasi 72 jam								Kontrol			
		Inokulum 5% (v/v)				Inokulum 10% (v/v)							
Substrat		Lignin	Selulosa	HS	Lignin	Selulosa	HS	Lignin	Selulosa	HS			
<i>S. cerevisiae</i>	10 gram	R <sub>1</sub> =	3,23	9,54	12,04	R <sub>5</sub> =	2,43	7,79	17,17	R <sub>17</sub> =	3,60	8,75	11,27
	20 gram	R <sub>3</sub> =	2,16	7,44	13,62	R <sub>7</sub> =	3,34	9,64	11,83	R <sub>19</sub> =	3,47	8,03	10,09
<i>Z. mobilis</i>	10 gram	R <sub>9</sub> =	3,94	9,56	10,78	R <sub>13</sub> =	3,74	8,45	15,35	R <sub>17</sub> =	3,60	8,75	11,27
	20 gram	R <sub>11</sub> =	5,19	7,43	12,22	R <sub>15</sub> =	3,57	9,43	11,54	R <sub>19</sub> =	3,47	8,03	10,09

Keterangan, HS : Hemiselulosa



### 5. Absorbansi Pembuatan Kurva Kalibrasi

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi
0	0
2	0,101
4	0,182
6	0,26
8	0,351
10	0,470



Perhitungan konversi absorbansi menjadi mg/L

$$X = \frac{\text{Absorbansi} - 0,00033}{0,045} \times \text{faktor pengencer}$$

### 6. Analisa Gula Reduksi Setelah Hidrolisis

M.O	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>				Kontrol
Substrat	2 : 1				
10 Gram (1)	R <sub>1</sub> = 20,764	R <sub>5</sub> = 14,156	R <sub>9</sub> = 16,887	R <sub>13</sub> = 9,310	R <sub>17</sub> = 17,240
10 Gram (2)	R <sub>2</sub> = 10,191	R <sub>6</sub> = 10,896	R <sub>10</sub> = 9,222	R <sub>14</sub> = 12,570	R <sub>18</sub> = 15,566
20 Gram (1)	R <sub>3</sub> = 11,337	R <sub>7</sub> = 22,350	R <sub>11</sub> = 29,486	R <sub>15</sub> = 16,094	R <sub>19</sub> = 18,561
20 Gram (2)	R <sub>4</sub> = 14,773	R <sub>8</sub> = 11,337	R <sub>12</sub> = 20,940	R <sub>16</sub> = 25,786	R <sub>20</sub> = 13,715

## 7. Analisa Gula Reduksi Setelah Fermentasi

M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat		Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	
48 Jam	10 Gram (1)	R <sub>1</sub> = 27,548	R <sub>5</sub> = 22,702	R <sub>9</sub> = 29,046	R <sub>13</sub> = 22,438	R <sub>17</sub> = 23,936
	10 Gram (2)	R <sub>2</sub> = 16,711	R <sub>6</sub> = 19,707	R <sub>10</sub> = 26,138	R <sub>14</sub> = 15,125	R <sub>18</sub> = 16,711
	20 Gram (1)	R <sub>3</sub> = 36,270	R <sub>7</sub> = 25,698	R <sub>11</sub> = 25,962	R <sub>15</sub> = 23,936	R <sub>19</sub> = 17,680
	20 Gram (2)	R <sub>4</sub> = 28,958	R <sub>8</sub> = 26,315	R <sub>12</sub> = 27,989	R <sub>16</sub> = 33,363	R <sub>20</sub> = 13,715
72 jam	10 Gram (1)	R <sub>1</sub> = 15,213	R <sub>5</sub> = 21,645	R <sub>9</sub> = 22,174	R <sub>13</sub> = 27,724	R <sub>17</sub> = 26,226
	10 Gram (2)	R <sub>2</sub> = 15,478	R <sub>6</sub> = 16,182	R <sub>10</sub> = 21,028	R <sub>14</sub> = 18,297	R <sub>18</sub> = 28,958
	20 Gram (1)	R <sub>3</sub> = 22,526	R <sub>7</sub> = 27,636	R <sub>11</sub> = 24,200	R <sub>15</sub> = 24,288	R <sub>19</sub> = 28,341
	20 Gram (2)	R <sub>4</sub> = 21,204	R <sub>8</sub> = 24,641	R <sub>12</sub> = 16,799	R <sub>16</sub> = 20,940	R <sub>20</sub> = 16,535

## 8. Hasil Pengukuran Kadar Etanol (% v/v)

M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat		Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	
48 jam	10 Gram (1)	0,0066	0,0112	0,0045	0,0013	0,0000
	10 Gram (2)	0,0084	0,0119	0,0083	0,0013	0,0000
	20 Gram (1)	0,0015	0,0035	0,0013	0,0019	0,0000
	20 Gram (2)	0,0009	0,0018	0,0032	0,0012	0,0000
72 jam	10 Gram (1)	0,0019	0,0045	0,0012	0,0013	0,0000
	10 Gram (2)	0,0032	0,0046	0,0010	0,0018	0,0000
	20 Gram (1)	0,0014	0,0021	0,0011	0,0016	0,0000
	20 Gram (2)	0,0000	0,0017	0,0015	0,0000	0,0000

### 9. Analisa Kadar Etanol (mg/g)

M.O		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i>		Kontrol
Substrat		Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	Inokulum 5% (v/v)	Inokulum 10% (v/v)	
48 jam	10 Gram (1)	0,6610	1,1178	0,4533	0,1291	0,0000
	10 Gram (2)	0,8390	1,1945	0,8342	0,1291	0,0000
	20 Gram (1)	0,1545	0,3538	0,1314	0,1873	0,0000
	20 Gram (2)	0,0950	0,1767	0,3193	0,1176	0,0000
72 Jam	10 Gram (1)	0,1901	0,4532	0,1182	0,1316	0,0000
	10 Gram (2)	0,3192	0,4643	0,0959	0,1769	0,0000
	20 Gram (1)	0,1393	0,2087	0,1076	0,1645	0,0000
	20 Gram (2)	0,0000	0,1685	0,1494	0,0000	0,0000

Analisis terhadap pH menunjukkan nilai pH pada awal substrat sebelum pretreatment adalah 7, selama pretreatment, hidrolisis dan fermentasi pH menunjukkan pH 7.

### LAMPIRAN 3

#### HASIL ANALISA STATISTIK

#### LAMPIRAN

#### HASIL ANALISA DATA RESPON SURFACE (NADIA)

##### 1. Analisis dengan menggunakan Respon Surface (Minitab 16)

##### Response Surface Regression: etanol versus MO; Konsentrasi; Waktu; Substrat

Estimated Regression Coefficients for etanol

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,003053	0,000258	11,817	0,000
MO	-0,001022	0,000258	-3,955	0,001
Konsentrasi	0,000178	0,000258	0,689	0,498
Waktu	-0,001247	0,000258	-4,826	0,000
Substrat	-0,001509	0,000258	-5,842	0,000
MO*Konsentrasi	-0,000909	0,000258	-3,520	0,002
MO*Waktu	0,000403	0,000258	1,560	0,134
MO*Substrat	0,000953	0,000258	3,689	0,001
Konsentrasi*Waktu	0,000216	0,000258	0,835	0,413
Konsentrasi*Substrat	0,000003	0,000258	0,012	0,990
Waktu*Substrat	0,000878	0,000258	3,399	0,003

S = 0,00146156 PRESS = 0,000104163

R-Sq = 84,47% R-Sq(pred) = 63,94% R-Sq(adj) = 77,07%

Analysis of Variance for etanol

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	10	0,000244	0,000244	0,000024	11,42	0,000
Linear	4	0,000157	0,000157	0,000039	18,38	0,000
MO	1	0,000033	0,000033	0,000033	15,64	0,001
Konsentrasi	1	0,000001	0,000001	0,000001	0,48	0,498
Waktu	1	0,000050	0,000050	0,000050	23,29	0,000
Substrat	1	0,000073	0,000073	0,000073	34,13	0,000
Interaction	6	0,000087	0,000087	0,000014	6,78	0,000
MO*Konsentrasi	1	0,000026	0,000026	0,000026	12,39	0,002
MO*Waktu	1	0,000005	0,000005	0,000005	2,43	0,134
MO*Substrat	1	0,000029	0,000029	0,000029	13,61	0,001
Konsentrasi*Waktu	1	0,000001	0,000001	0,000001	0,70	0,413
Konsentrasi*Substrat	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	0,990
Waktu*Substrat	1	0,000025	0,000025	0,000025	11,55	0,003
Residual Error	21	0,000045	0,000045	0,000002		
Lack-of-Fit	5	0,000029	0,000029	0,000006	5,67	0,003
Pure Error	16	0,000016	0,000016	0,000001		
Total	31	0,000289				

Unusual Observations for etanol

Obs	StdOrder	etanol	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
18	33	0,008	0,005	0,001	0,003	2,57 R

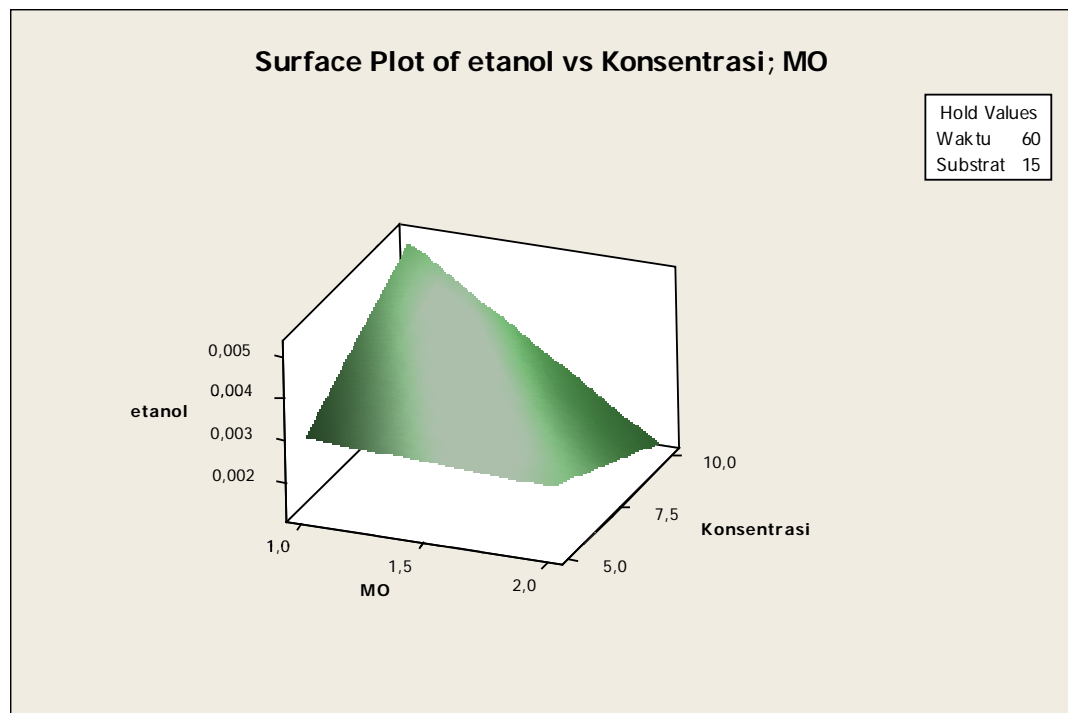
R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for etanol using data in uncoded units

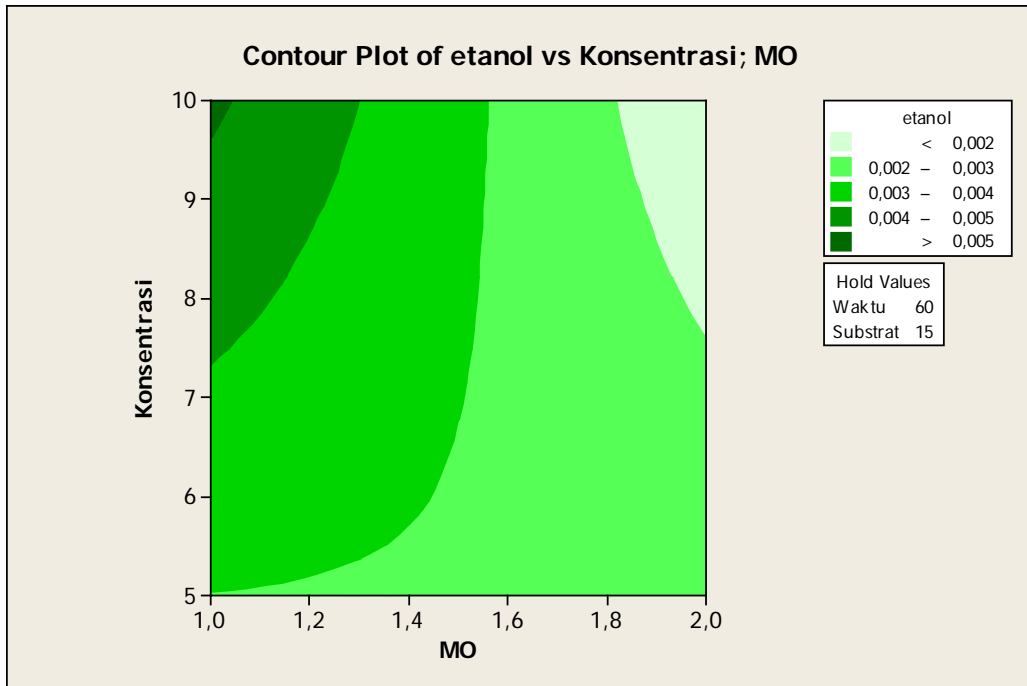
Term	Coef
Constant	0,0319469
MO	0,000937500
Konsentrasi	0,00145500
Waktu	-5,50000E-04
Substrat	-0,00175625
MO*Konsentrasi	-0,00145500
MO*Waktu	6,71875E-05
MO*Substrat	0,000381250
Konsentrasi*Waktu	1,43750E-05
Konsentrasi*Substrat	5,00000E-07
Waktu*Substrat	1,46354E-05

Selanjutnya ingin diketahui nilai optimasi antara variabel dari surface plot dan contour plot sebagai berikut:

# 1. Mo dan konsentrasi

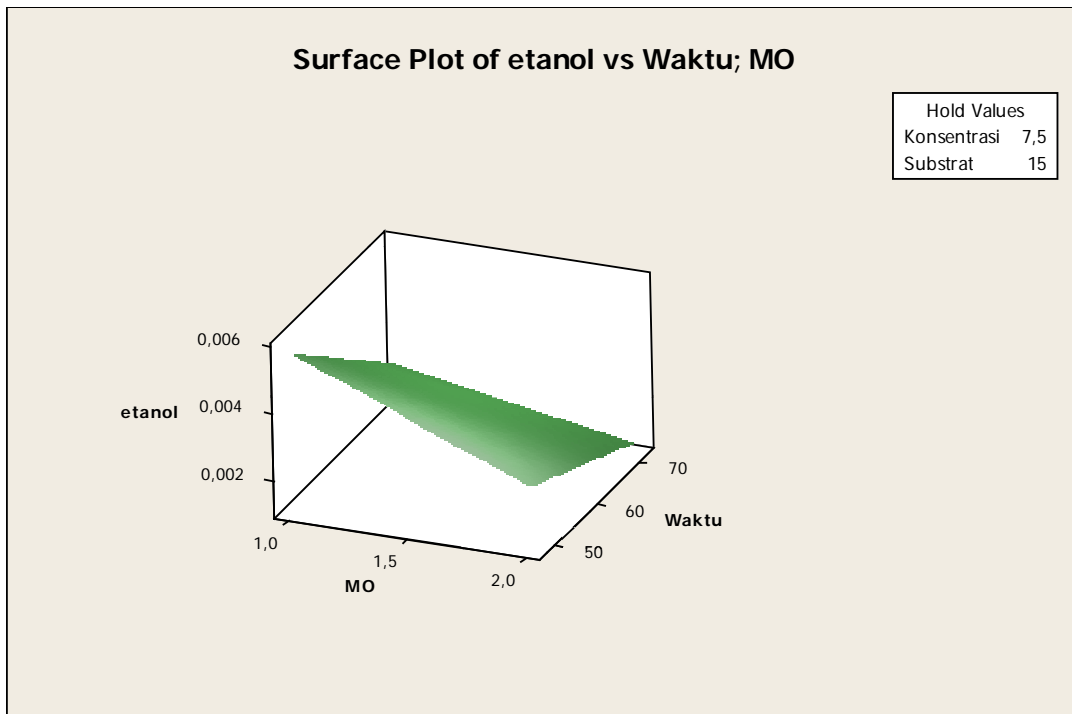


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%

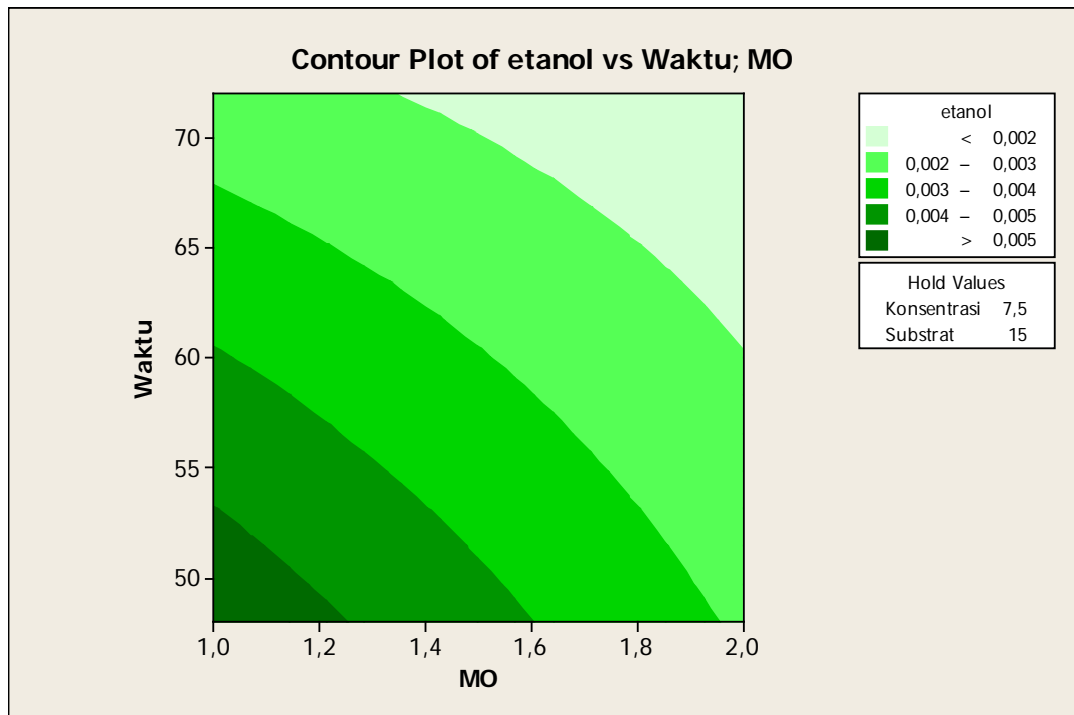


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%

## 2. Mo dan waktu

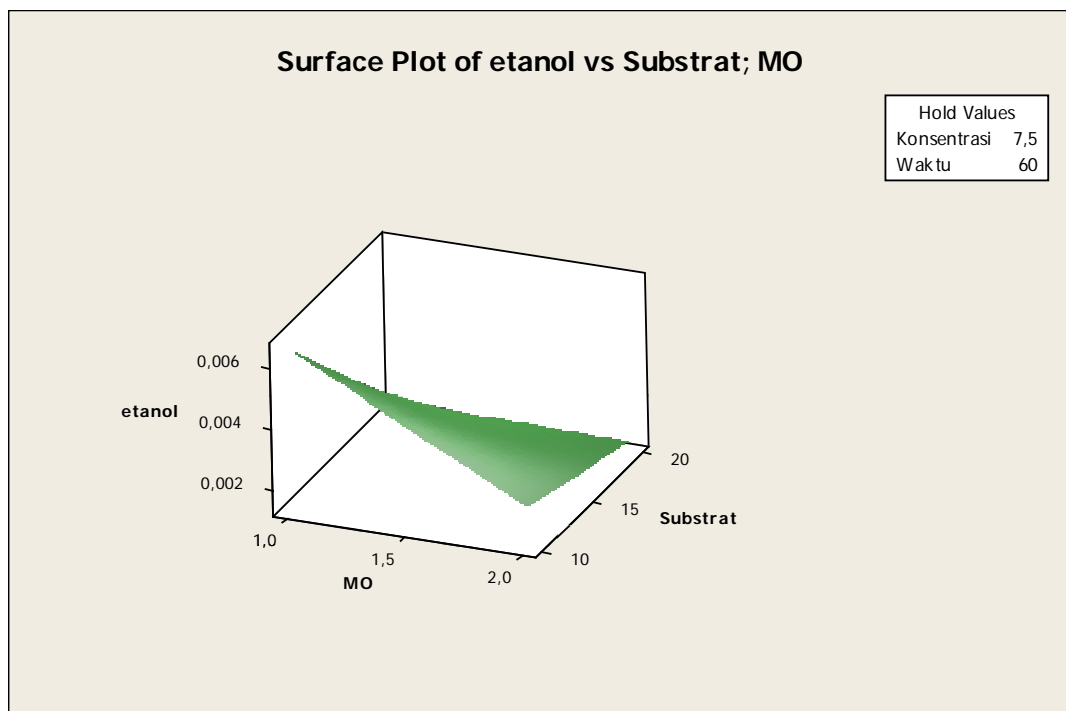


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel waktu adalah pada 48 jam.

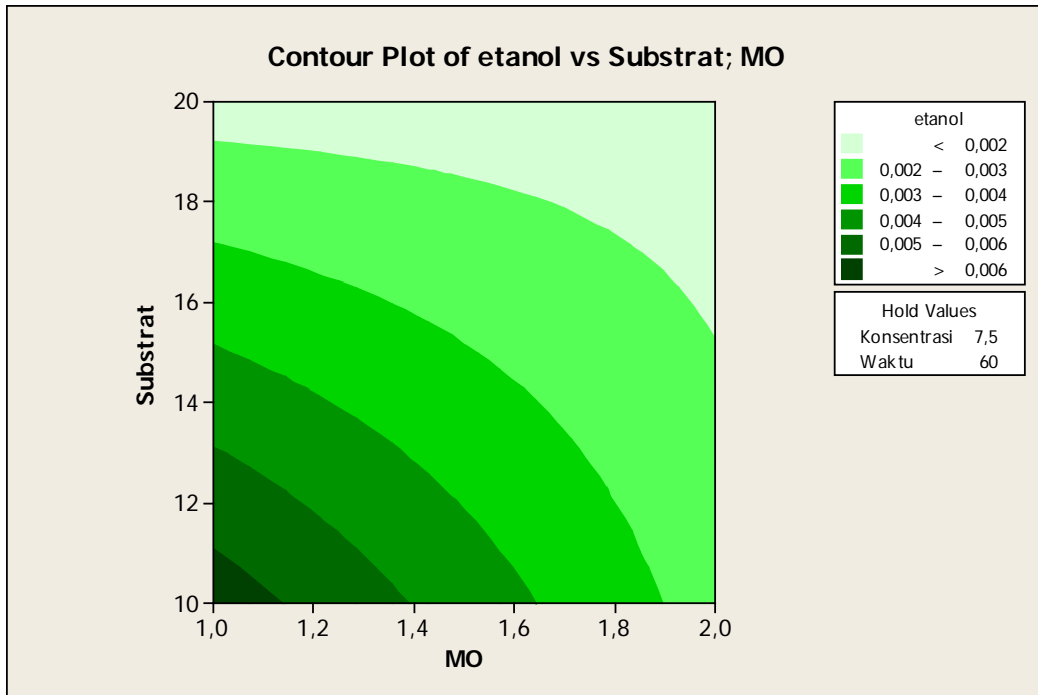


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel waktu adalah pada 48 jam.

### 3. Mo dan substrat

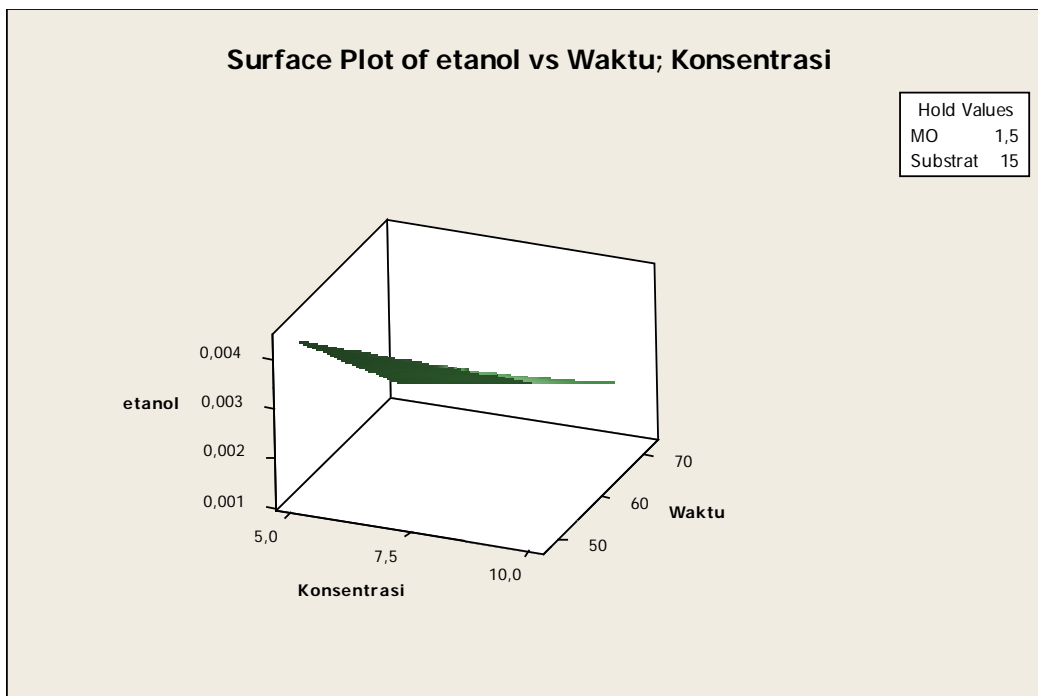


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel substrat adalah pada 10 gram.



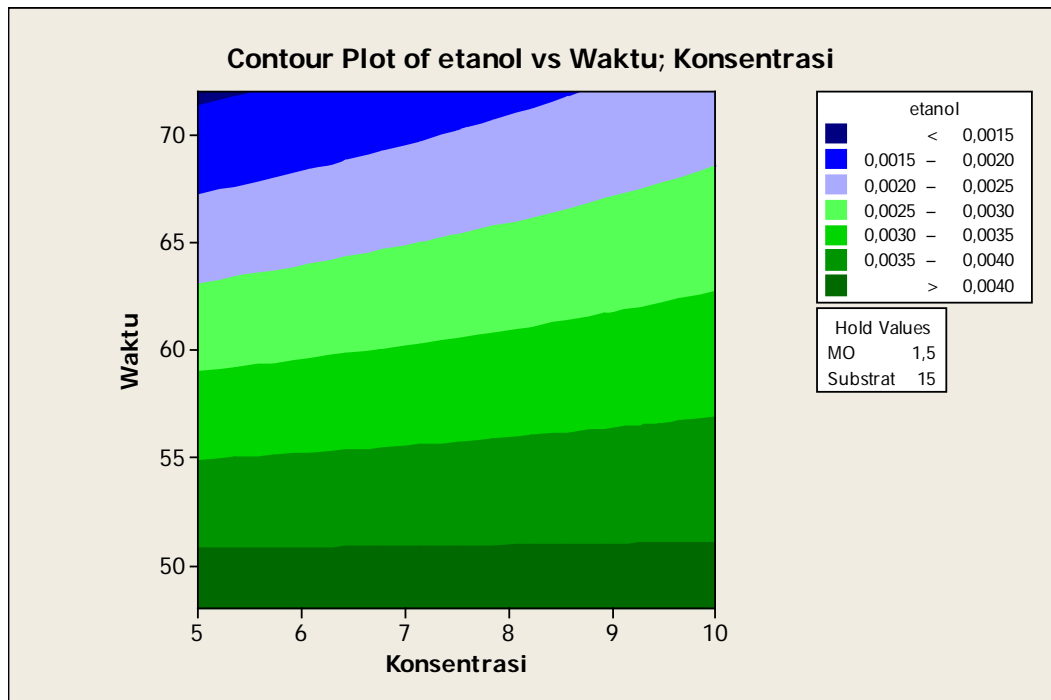
Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel MO adalah pada MO pertama dan untuk variabel substrat adalah pada 10 gram.

#### 4. Konsentrasi dan waktu



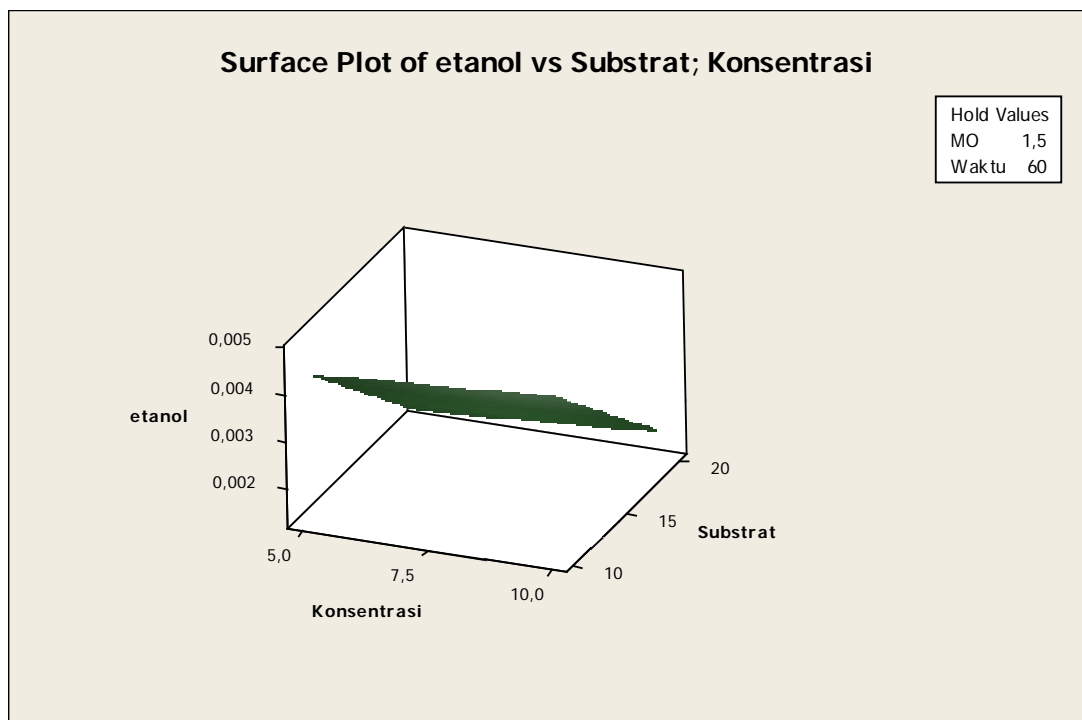
Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel waktu adalah pada 48 jam dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%.



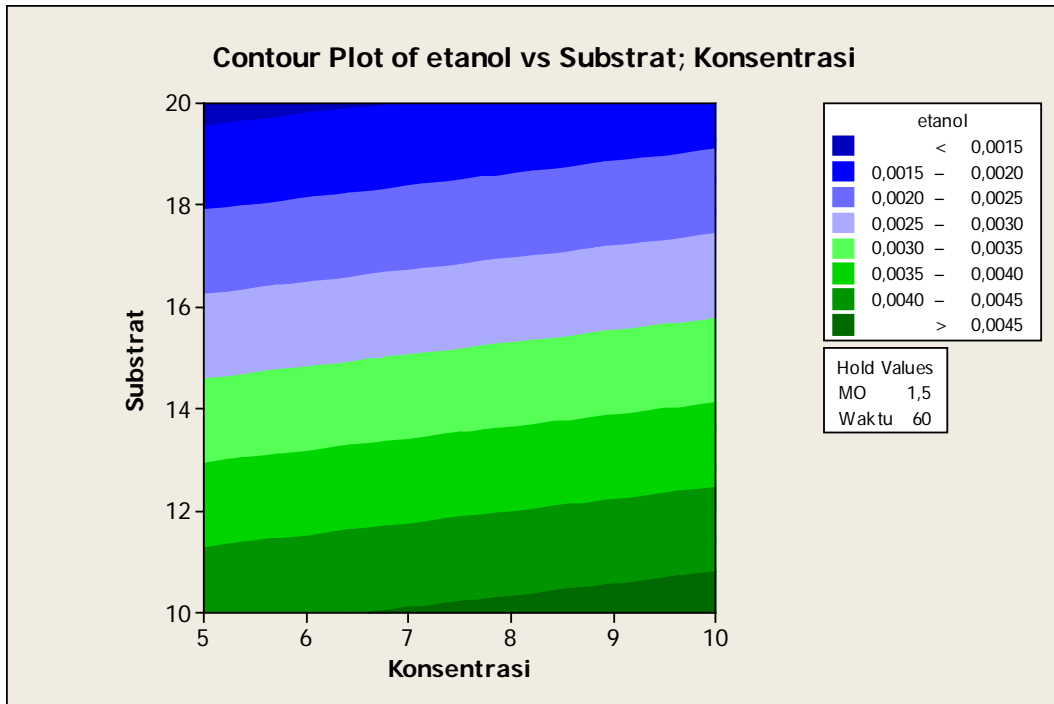


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel waktu adalah pada 48 jam dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%.

##### 5. Konsentrasi dan substrat

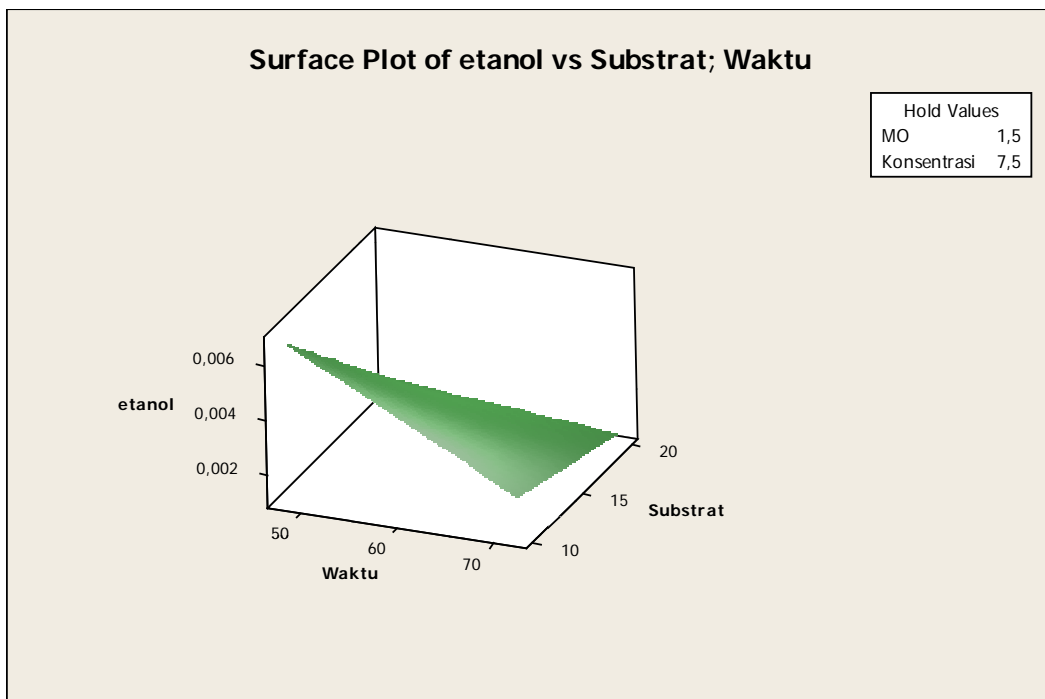


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel substrat adalah pada 10 gram dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%.

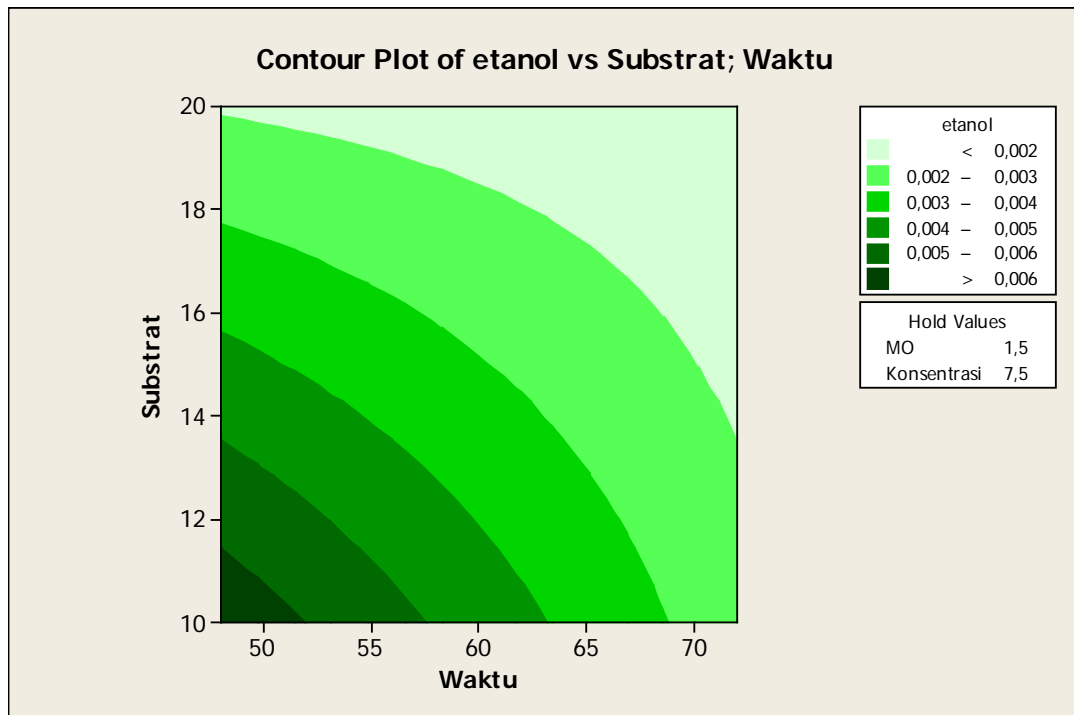


Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel substrat adalah pada 10 gram dan untuk variabel konsentrasi adalah pada 10%.

#### 6. Waktu dan substrat



Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel substrat adalah pada 10 gram dan untuk variabel waktu adalah pada 48 jam.



Gambar diatas menunjukkan bahwa nilai yang optimum untuk variabel substrat adalah pada 10 gram dan untuk variabel waktu adalah pada 48 jam.

#### Kesimpulan Secara Umum

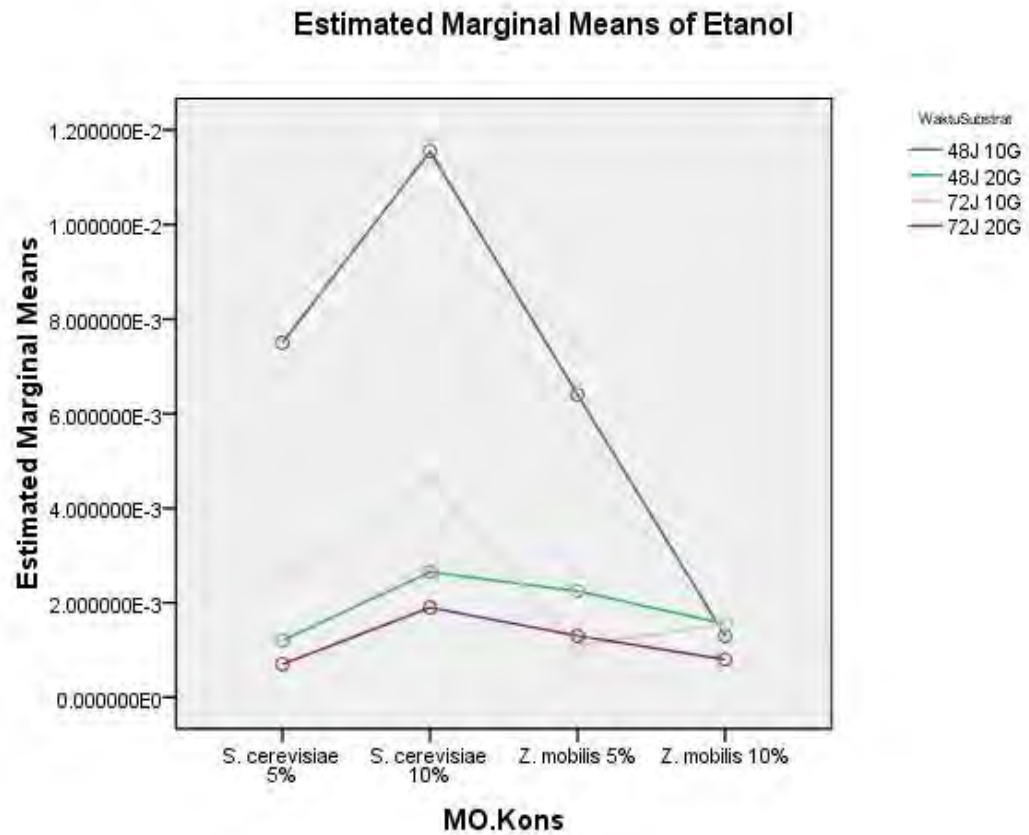
Variabel	Kode	frekuensi
MO	1	3
	2	
Konsentrasi (%)	5	
	10	3
Waktu	72	
	48	3
Substrat (gram)	10	3
	20	

Berdasarkan hasil contour plot dan surface plot dapat disimpulkan bahwa nilai yang optimum adalah:

1. Mikroorganisme yg pertama
2. Konsentrasi 10%
3. Waktu 48 jam
4. Substrat 10 gram

Plot data menggunakan SPSS untuk hasil etanol tertinggi

No.	Nilai Etanol	MO*Konsentrasi	Waktu*Substrat
1	0,007	1	1
2	0,008	1	1
3	0,002	1	2
4	0,001	1	2
5	0,002	1	3
6	0,003	1	3
7	0,001	1	4
8	0,000	1	4
9	0,011	2	1
10	0,012	2	1
11	0,004	2	2
12	0,002	2	2
13	0,005	2	3
14	0,005	2	3
15	0,002	2	4
16	0,002	2	4
17	0,005	3	1
18	0,008	3	1
19	0,001	3	2
20	0,003	3	2
21	0,001	3	3
22	0,001	3	3
23	0,001	3	4
24	0,001	3	4
25	0,001	4	1
26	0,001	4	1
27	0,002	4	2
28	0,001	4	2
29	0,001	4	3
30	0,002	4	3
31	0,002	4	4
32	0,000	4	4



Hasil contour plot dan surface plot sesuai dengan nilai plot diatas yang disimpulkan bahwa nilai yang optimum adalah

1. Mikroorganisme yg pertama
2. Konsentrasi 10%
3. Waktu 48 jam
4. Substrat 10 gram

## LAMPIRAN 4

### Gambar Proses Penelitian

#### 1. Preparasi Eceng Gondok



Batang eceng gondok yang telah dibersihkan



Eceng gondok yang telah dicacah



Tahap penjemuran (pengeringan) batang dan daun eceng gondok



Serbuk eceng gondok (substrat)



Substrat 10 gram yang dikemas

## 2. Pembiakan Mikroorganisme



Pembuatan media PDA



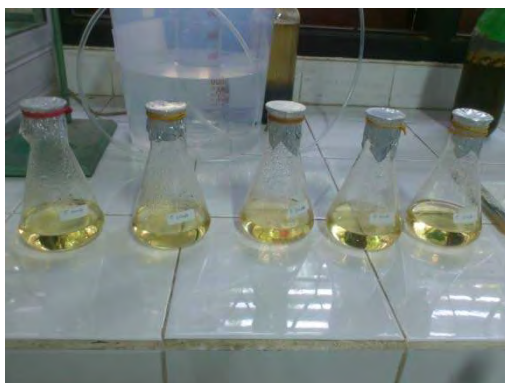
Jamur *P. chrysosporium* yang telah diinkubasi (terdapat spora putih)



Jamur *A. niger*



Jamur *T. viride*



Media PDB yang telah disterilisasi untuk membuat *starter*



Jarum ohse



### 3. Pretreatment



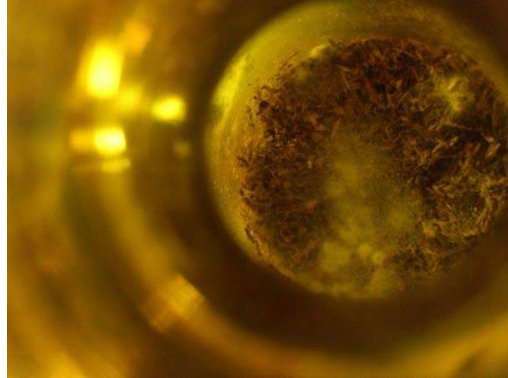
Starter *P. chrysosporium* yang telah di shaker



Persiapan reaktor dan media fermentasi



Media fermentasi yang telah di masukkan *P. chrysosporium*



Proses *pretreatment* (*P. chrysosporium*) pada permukaan media

### 4. Pengukuran Lignoselulosa dan Gula Reduksi



Penyaringan sampel substrat



Penyaringan substrat





Sampel gula reduksi yang akan diukur absorbansi

## 5. Sampel Etanol



Proses pengambilan sampel gula reduksi setelah fermentasi



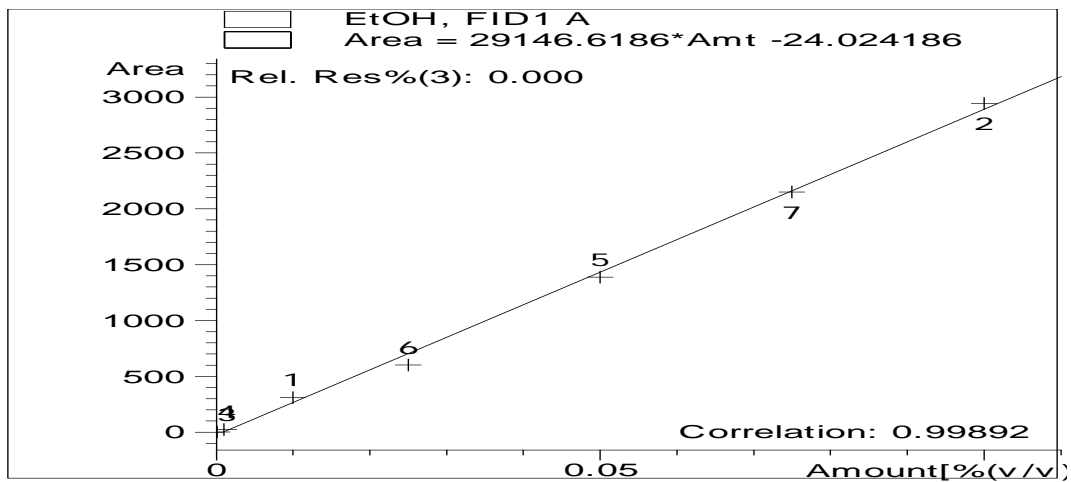
Proses pengambilan sampel etanol

## Lampiran 5

### Gambar Hasil Analisis GC

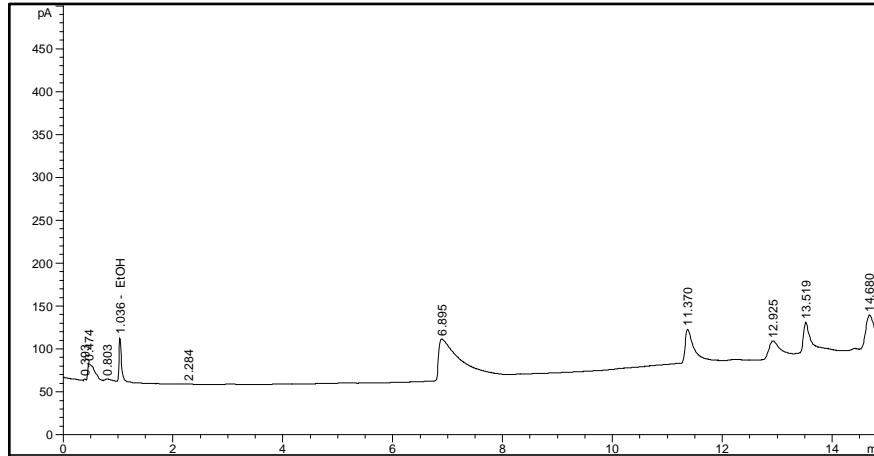
#### A. Kurva Kalibrasi

#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[%(v/v)]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD
1	1,014	FID1 A	EtOH	3	1,00E-04	2,797	3,58E-05	No	No
				4	1,00E-03	22,75	4,40E-05		
				1	0,01	309,53	3,23E-05		
				6	2,50E-02	601,38	4,16E-05		
				5	0,05	1387,5	3,60E-05		
				7	7,50E-02	2150,4	3,49E-05		
				2	0,1	2943,6	3,40E-05		



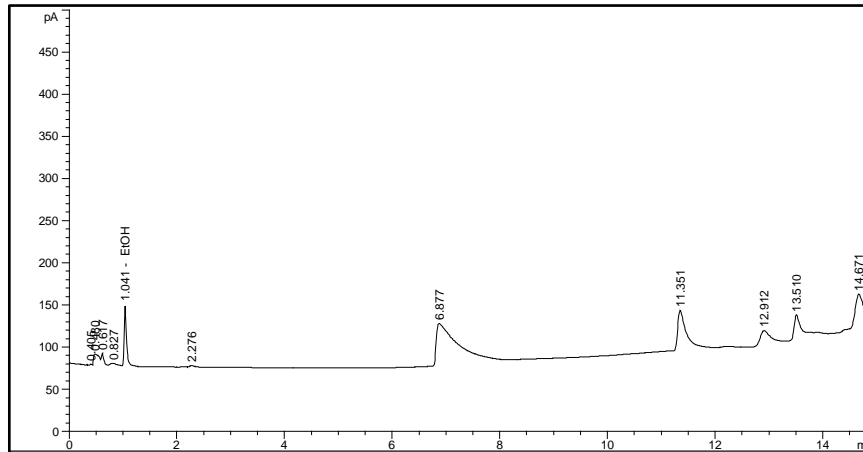
## Fermentasi Jam ke 48

### 1. Sampel R.1 (Y<sub>11111</sub>)



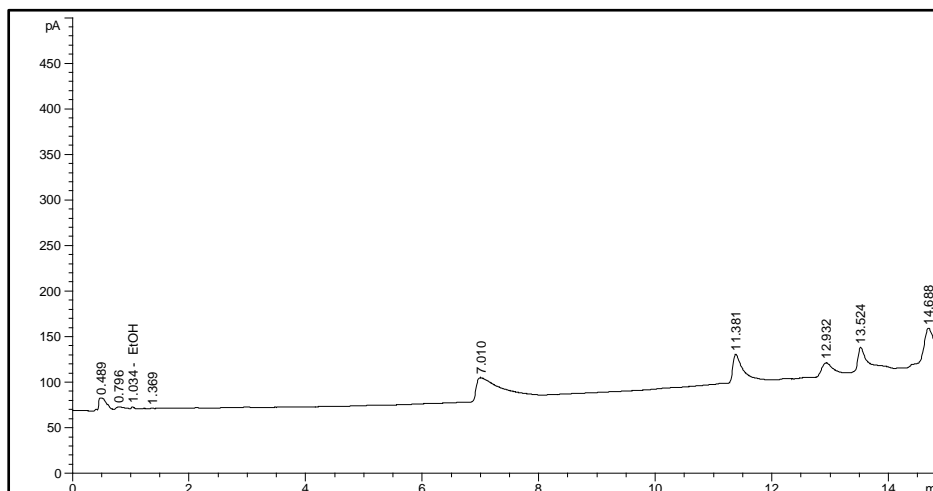
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.036	VP	168.63969	3.91970e-5	6.61016e-3		EtOH
Totals :				6.61016e-3		

### 2. Sampel R.2 (Y<sub>11112</sub>)



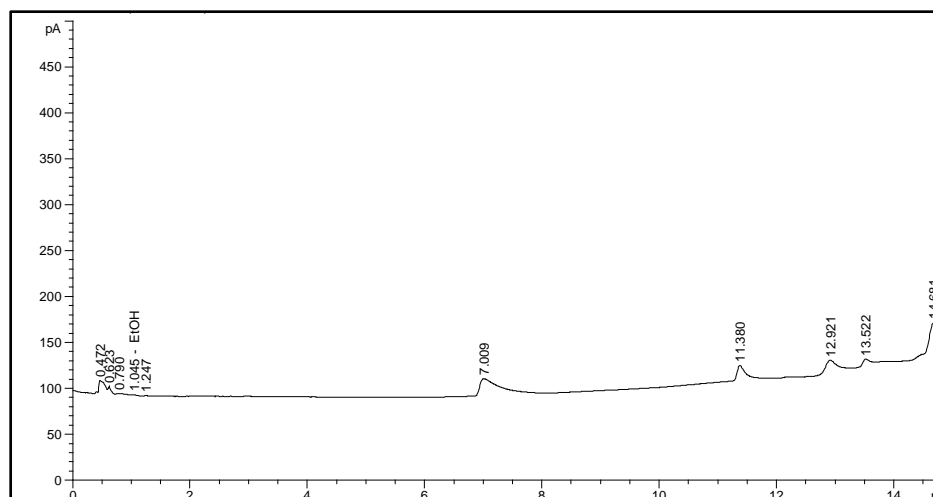
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.041	VP	220.52124	3.80470e-5	8.39018e-3		EtOH
Totals :				8.39018e-3		

### 3. Sampel R.3 (Y<sub>1121</sub>)



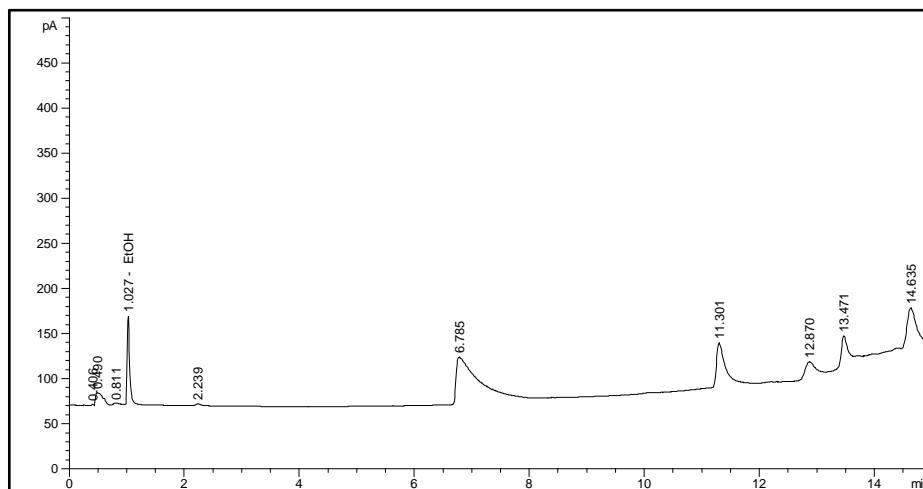
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.034	VV	21.02167	7.35190e-5	1.54549e-3		EtOH
Totals :				1.54549e-3		

### 4. Sampel R.4 (Y<sub>1122</sub>)



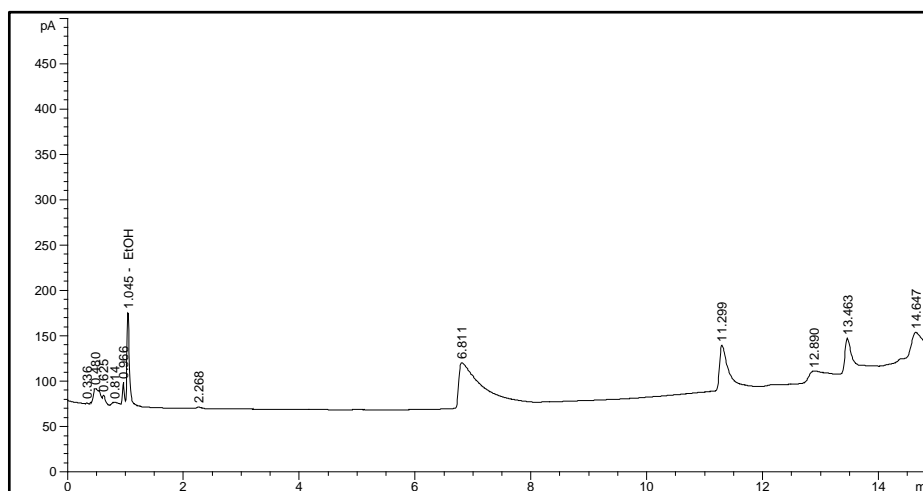
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.045	VP	3.65536	2.59801e-4	9.49666e-4		EtOH
Totals :				9.49666e-4		

## 5. Sampel R. 5 (Y<sub>12111</sub>)



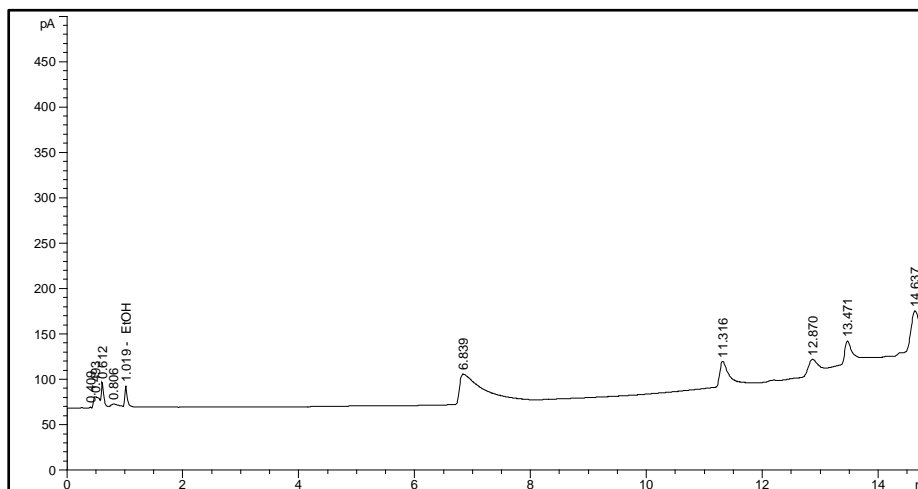
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.027	VB	301.77911	3.70406e-5	1.11781e-2		EtOH
Totals :				1.11781e-2		

## 6. Sampel R.6 (Y<sub>12112</sub>)



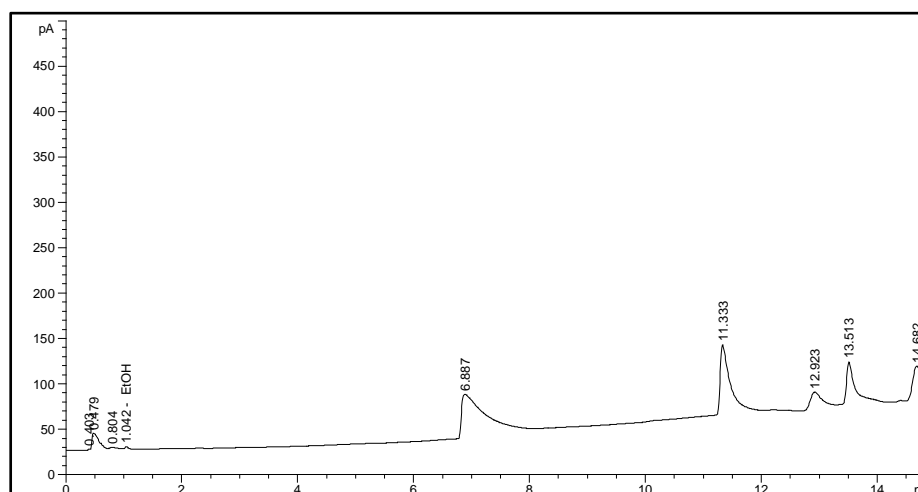
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.045	VB	324.12335	3.68523e-5	1.19447e-2		EtOH
Totals :				1.19447e-2		

## 7. Sampel R.7 (Y<sub>12121</sub>)



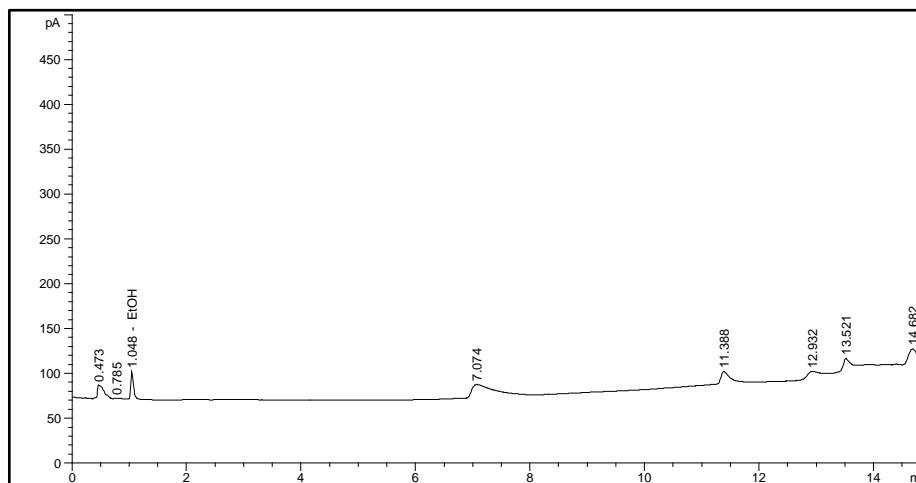
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.019	VV	79.10629	4.47289e-5	3.53833e-3		EtOH
Totals :				3.53833e-3		

## 8. Sampel R.8 (Y<sub>12122</sub>)



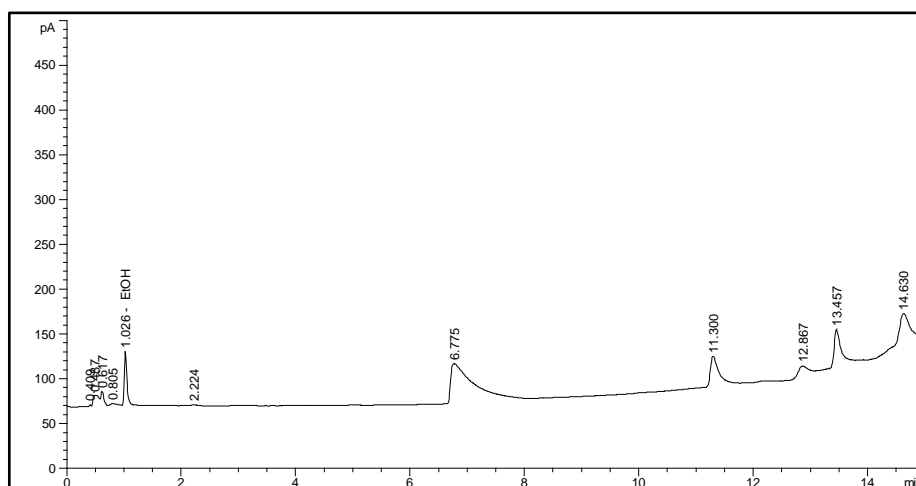
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.042	VV	27.48324	6.43004e-5	1.76919e-3		EtOH
Totals :				1.76919e-3		

## 9. Sampel R.9 (Y<sub>21111</sub>)



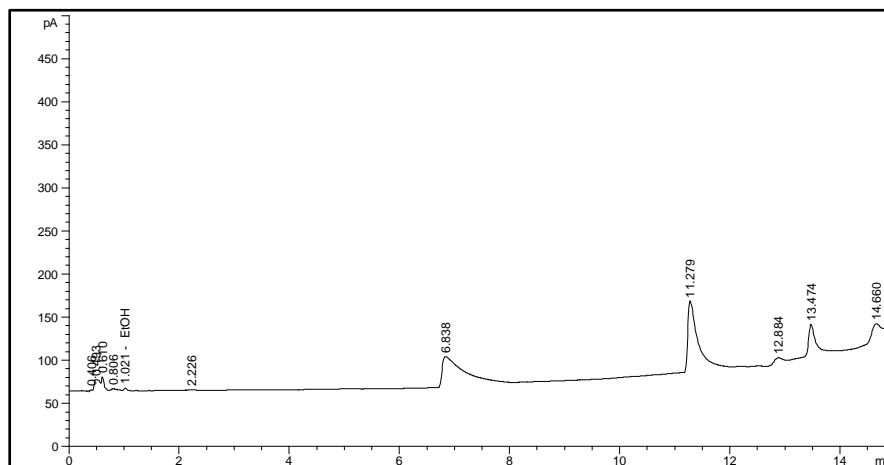
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.048	VP	108.05857	4.19371e-5	4.53254e-3		EtOH
Totals :				4.53254e-3		

## 10. Sampel R.10 (Y<sub>21112</sub>)



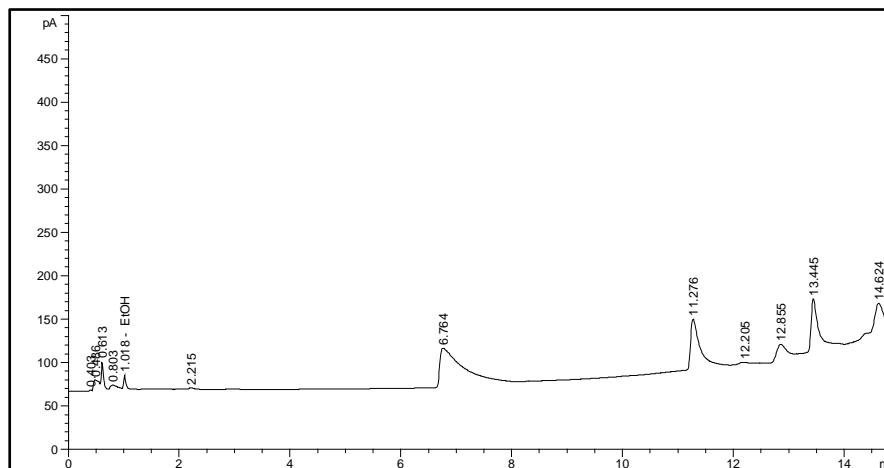
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.026	VV	219.11443	3.80710e-5	8.34191e-3		EtOH
Totals :				8.34191e-3		

# 11. Sampel R.11 (Y<sub>21121</sub>)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.021	VV	14.34103	9.17844e-5	1.31431e-3		EtOH
Totals :				1.31431e-3		

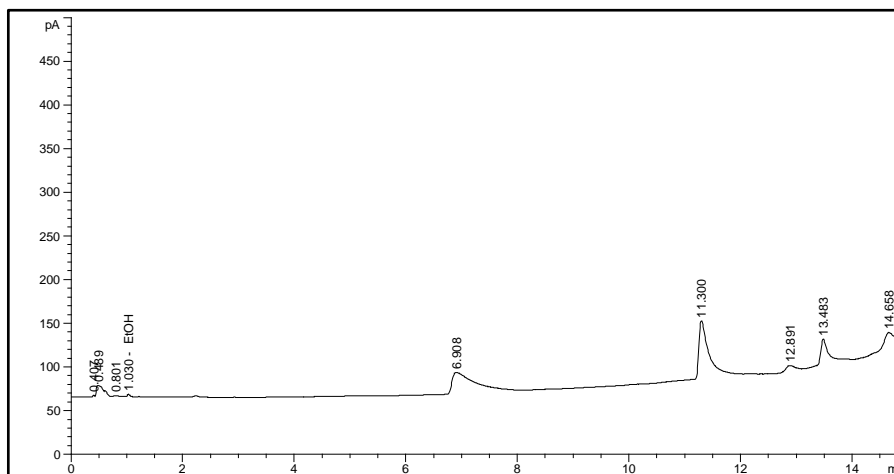
# 12. Sampel R.12 (Y<sub>21122</sub>)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.018	VV	69.03922	4.62482e-5	3.19294e-3		EtOH
Totals :				3.19294e-3		

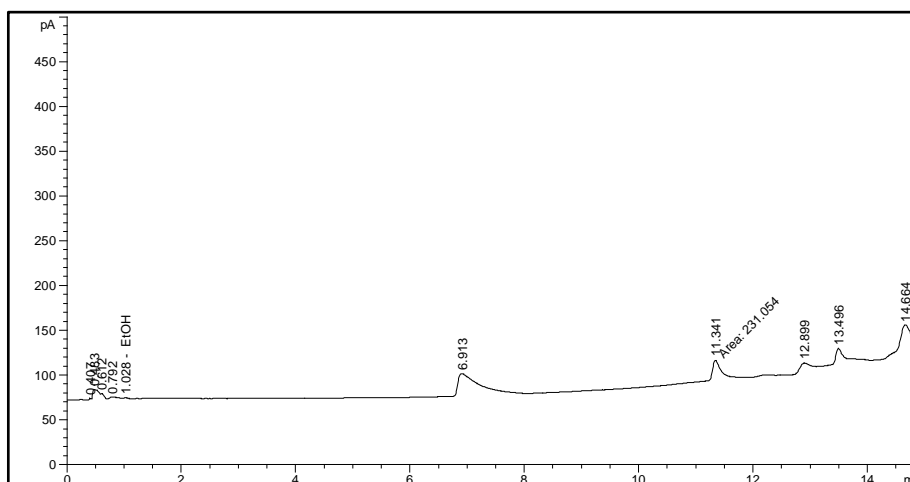


13. Sampel R.13 (Y<sub>22111</sub>)



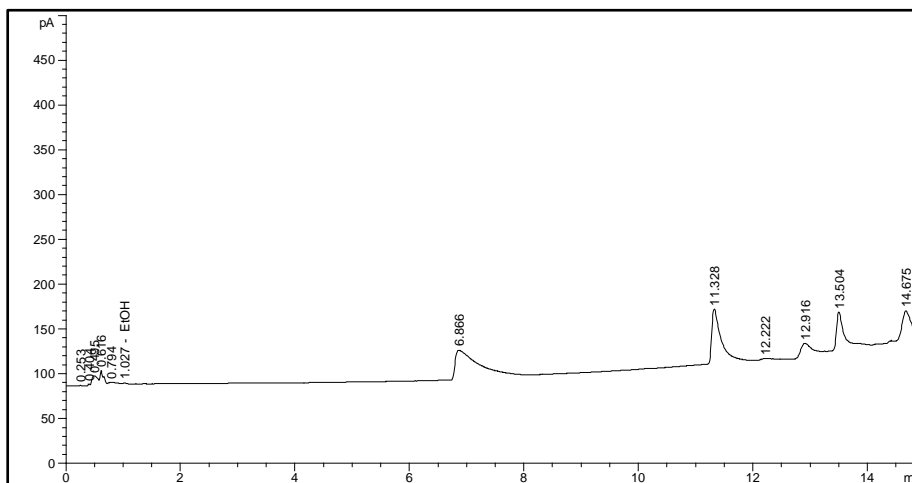
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.030	VV	13.59579	9.49349e-5	1.29071e-3		EtOH
Totals :				1.29071e-3		

14. Sampel R.14 (Y<sub>22112</sub>)



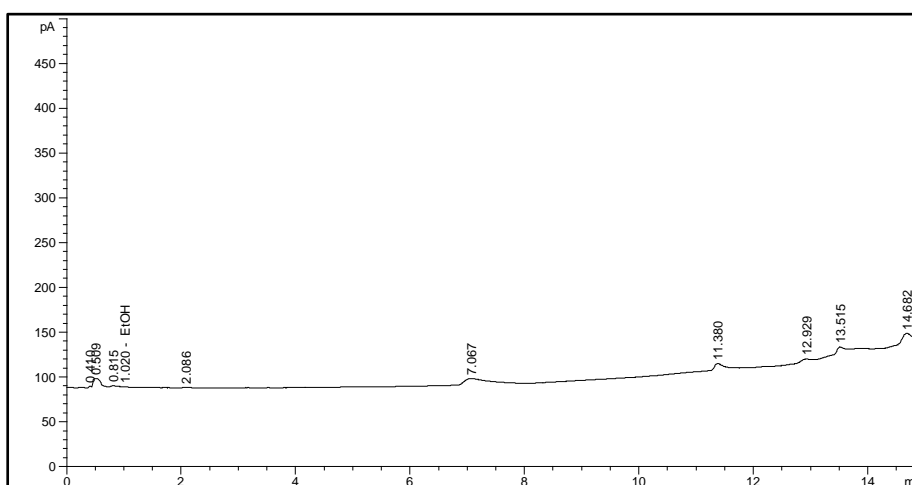
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.028	VV	13.60152	9.49094e-5	1.29091e-3		EtOH
Totals :				1.29091e-3		

15. Sampel R. 15 (Y<sub>22121</sub>)



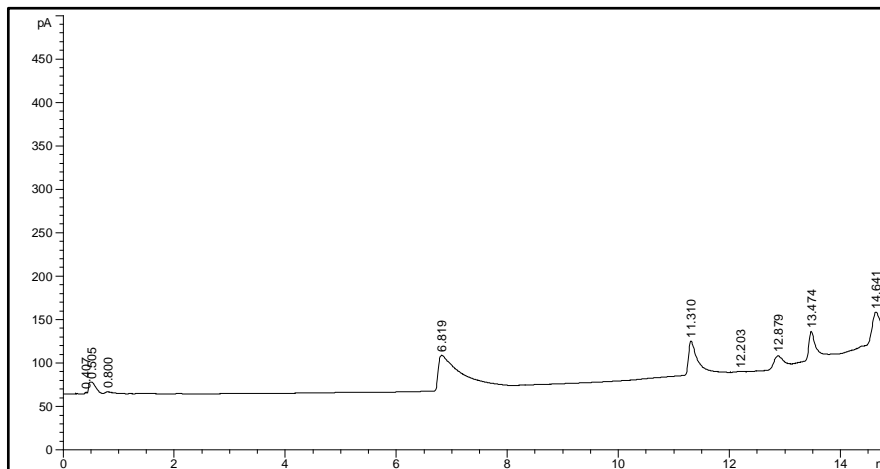
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.027	VV	30.57159	6.12707e-5	1.87314e-3		EtOH
Totals :				1.87314e-3		

16. Sampel R.16 (Y<sub>22122</sub>)



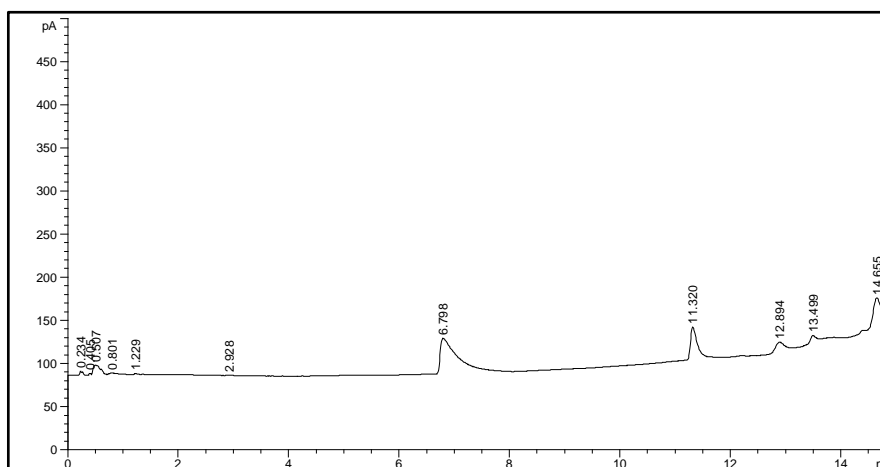
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.020	VV	7.35009	1.46451e-4	1.17648e-3		EtOH
Totals :				1.17648e-3		

17. Sampel R.17 (Kontrol 1)



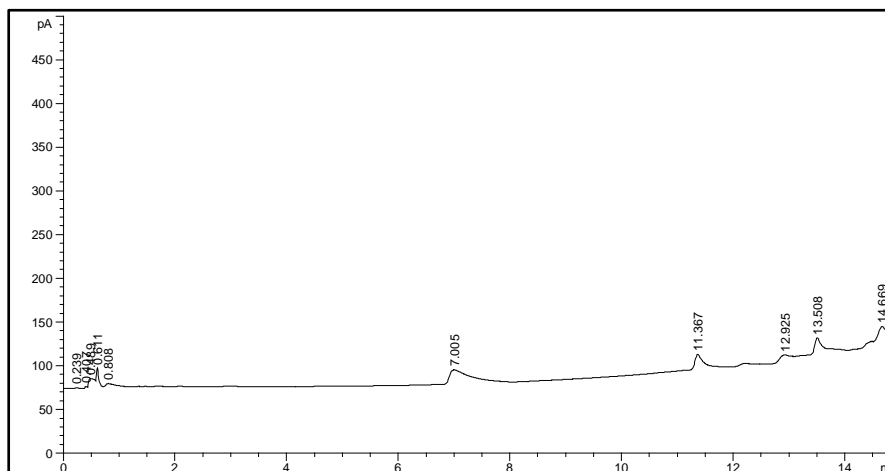
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

18. Sampel R.18 (kontrol 2)



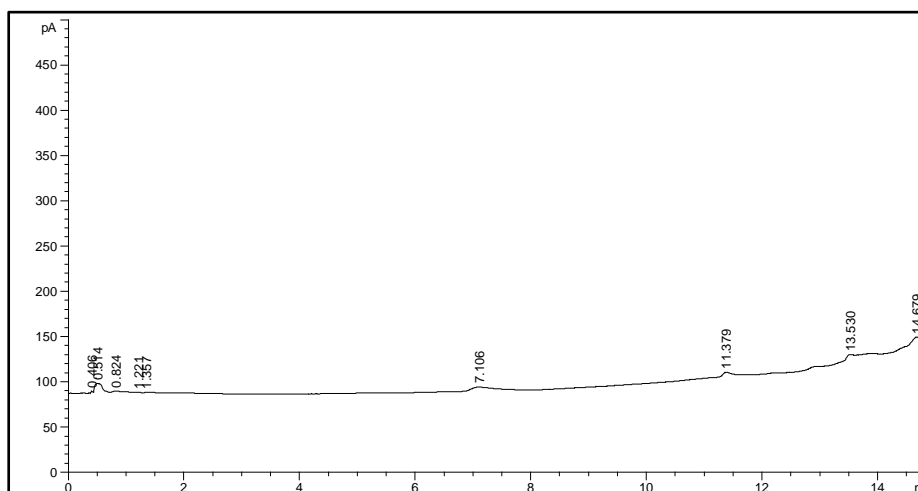
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

19. Sampel R.19 (kontrol 3)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

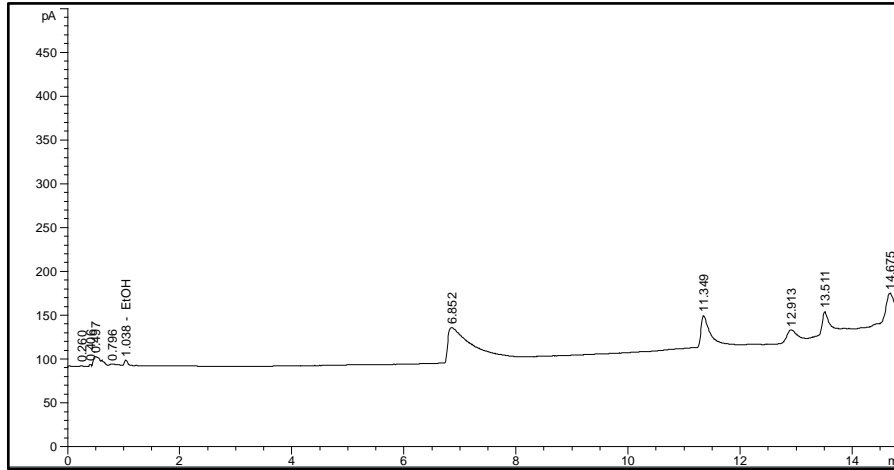
20. Sampel R.20 (kontrol 4)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

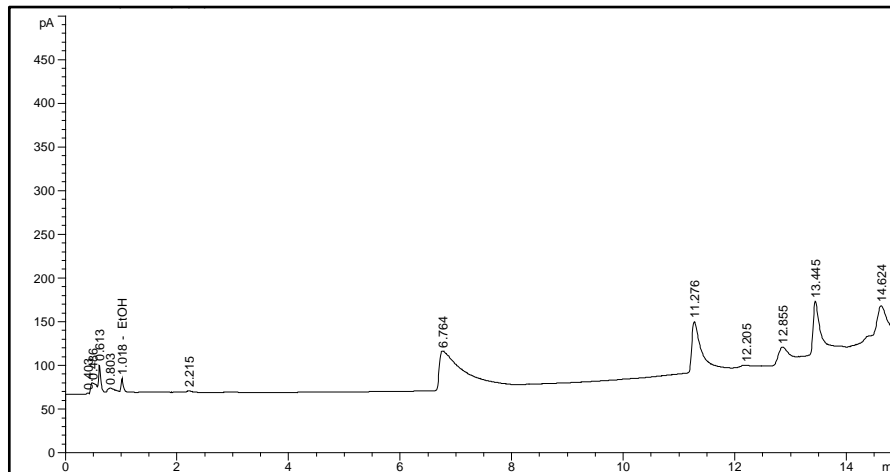
## Fermentasi Jam ke 72

### 21. Sampel R.1 (Y<sub>11211</sub>)



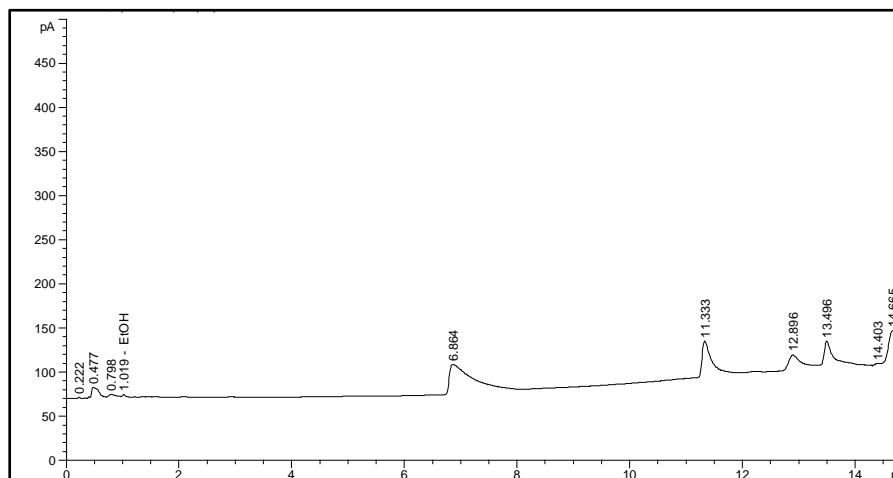
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.038	VV	31.39581	6.05629e-5	1.90142e-3		EtOH
Totals :				1.90142e-3		

### 22. Sampel R.2 (Y<sub>11212</sub>)



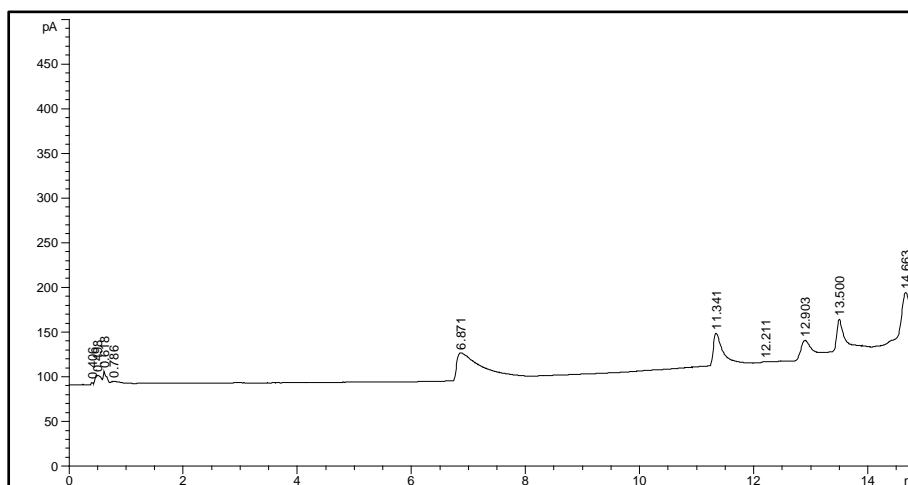
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.018	VV	69.03922	4.62482e-5	3.19196e-3		EtOH
Totals :				3.19196e-3		

23. Sampel R.3 (Y<sub>11221</sub>)



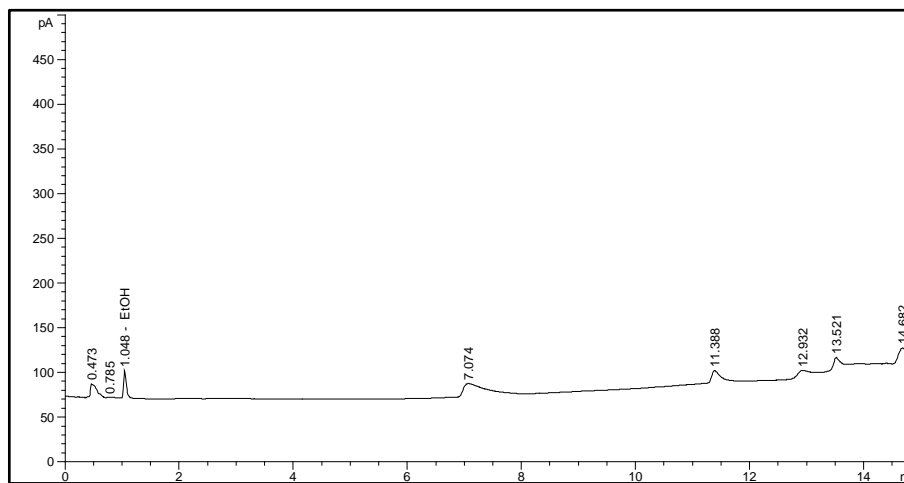
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.019	VV	16.58617	8.40045e-5	1.39331e-3		EtOH
Totals :				1.39331e-3		

24. Sampel R.4 (Y<sub>11222</sub>)



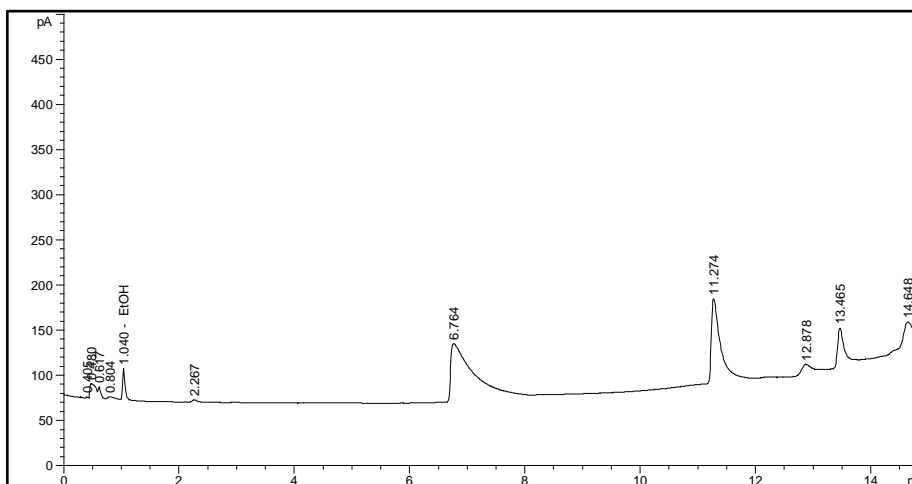
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024		-	-	-		EtOH
Totals :				0.00000		

25. Sampel R.5 (Y<sub>12211</sub>)



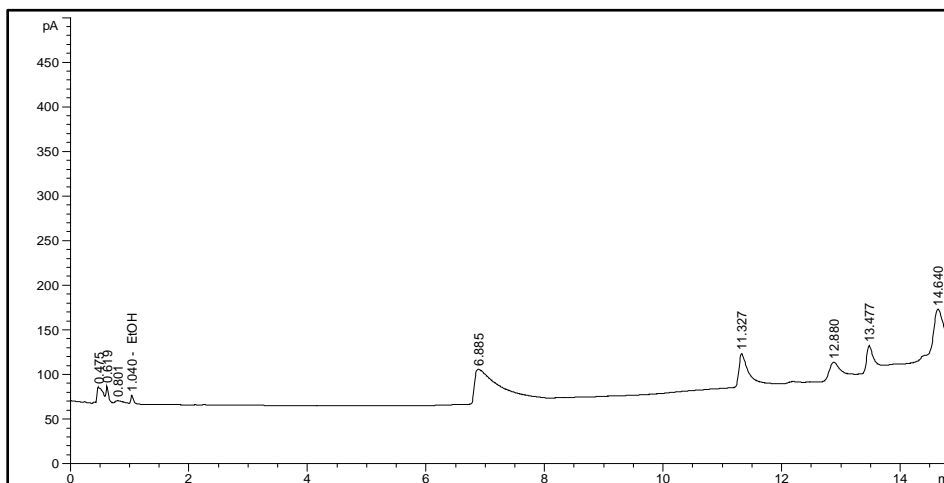
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.048	VP	108.05857	4.19371e-5	4.53167e-3		EtOH
Totals :				4.53167e-3		

26. Sampel R.6 (Y<sub>12212</sub>)



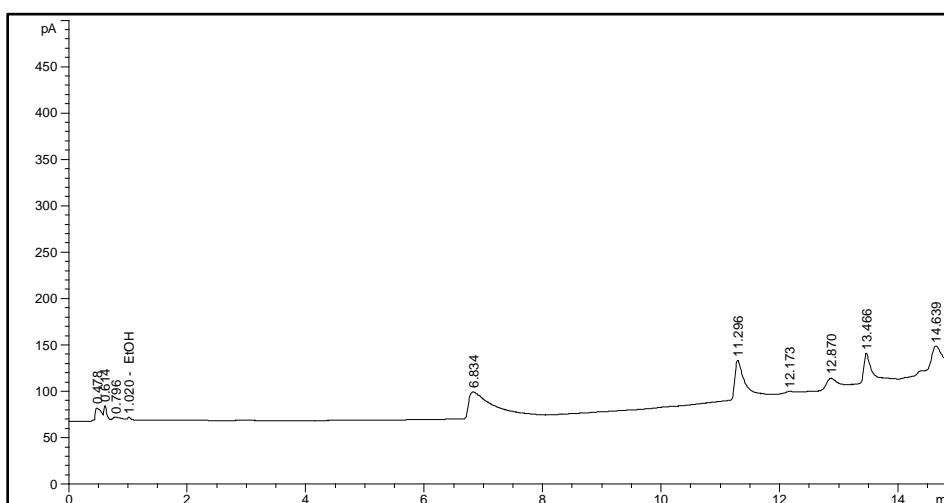
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.040	VP	111.31198	4.17142e-5	4.64329e-3		EtOH
Totals :				4.64329e-3		

27. Sampel R.7 (Y<sub>12221</sub>)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.040	VP	36.81842	5.66963e-5	2.08747e-3		EtOH
Totals :				2.08747e-3		

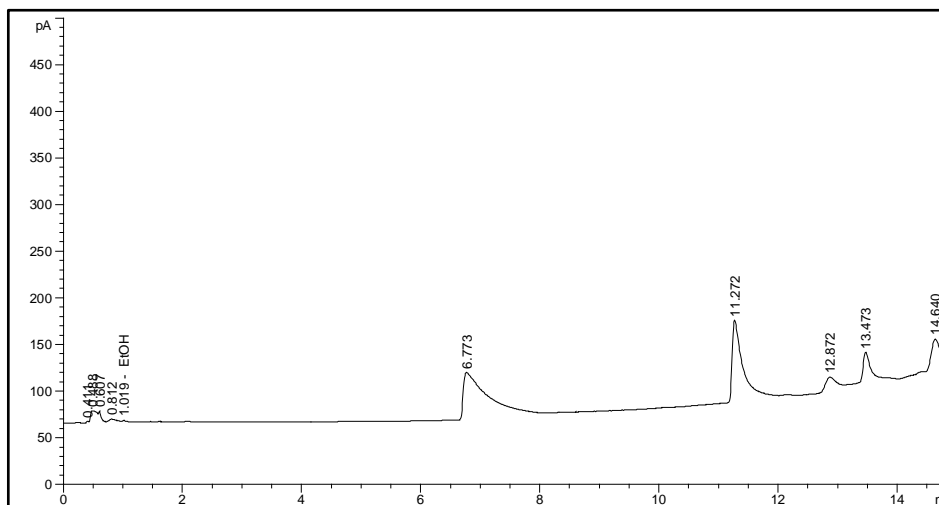
28. Sampel R.8 (Y<sub>12222</sub>)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.020	VV	25.08638	6.71659e-5	1.68495e-3		EtOH
Totals :				1.68495e-3		

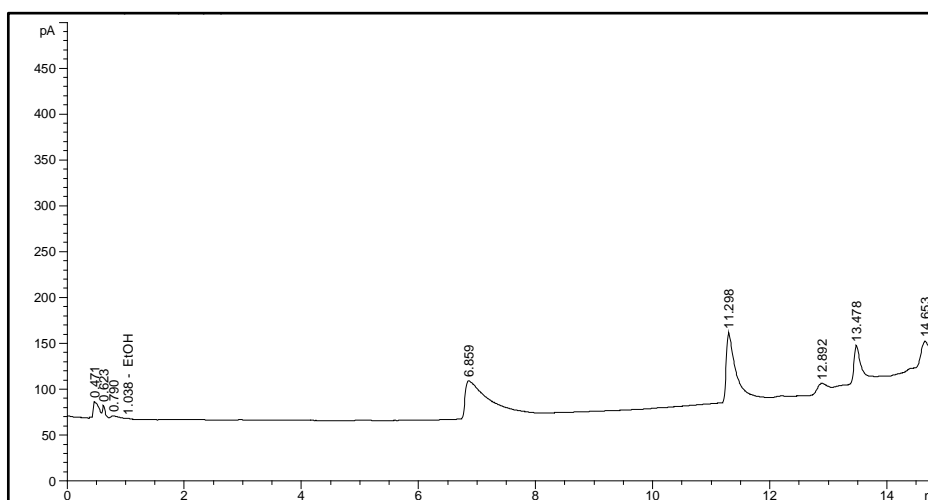


29. Sampel R.9 (Y<sub>21211</sub>)



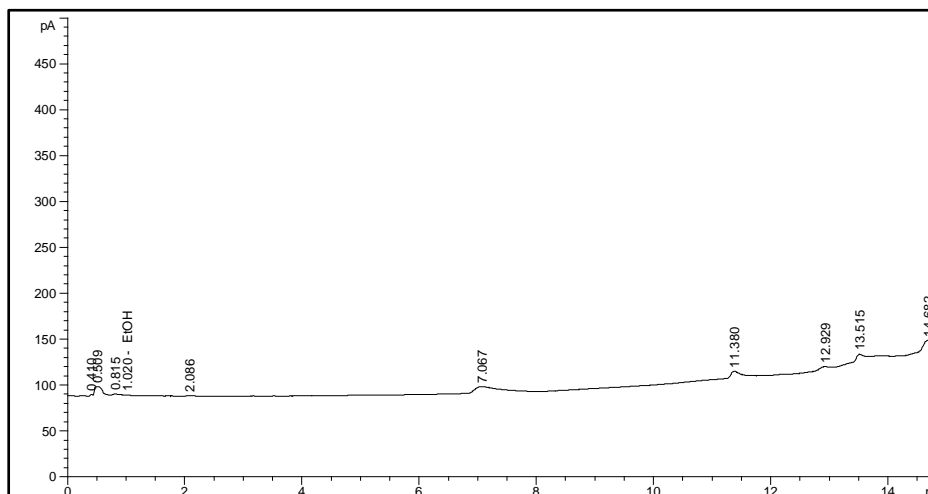
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.019	VV	10.43380	1.13308e-4	1.18223e-3		EtOH
Totals :				1.18223e-3		

30. Sampel R.10 (Y<sub>21212</sub>)



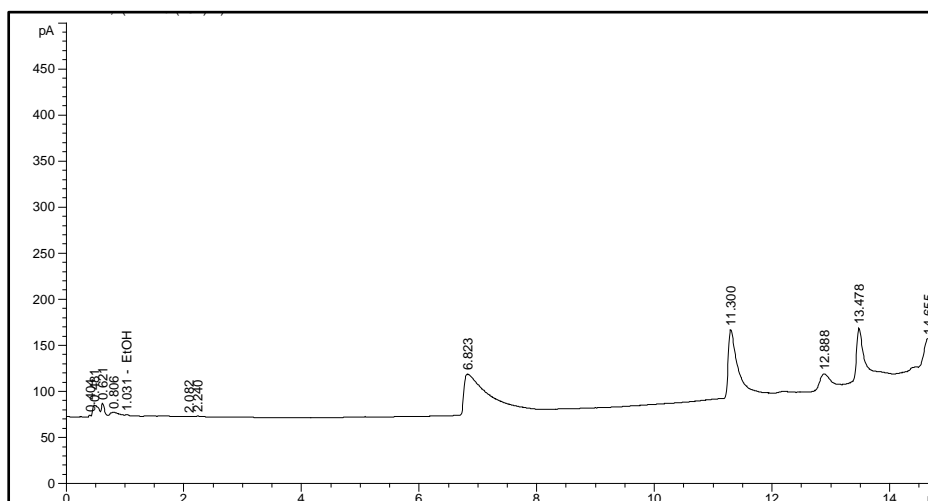
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.038	VP	4.22563	2.29370e-4	9.69231e-4		EtOH
Totals :				9.69231e-4		

### 31. Sampel R.11 (Y<sub>21221</sub>)



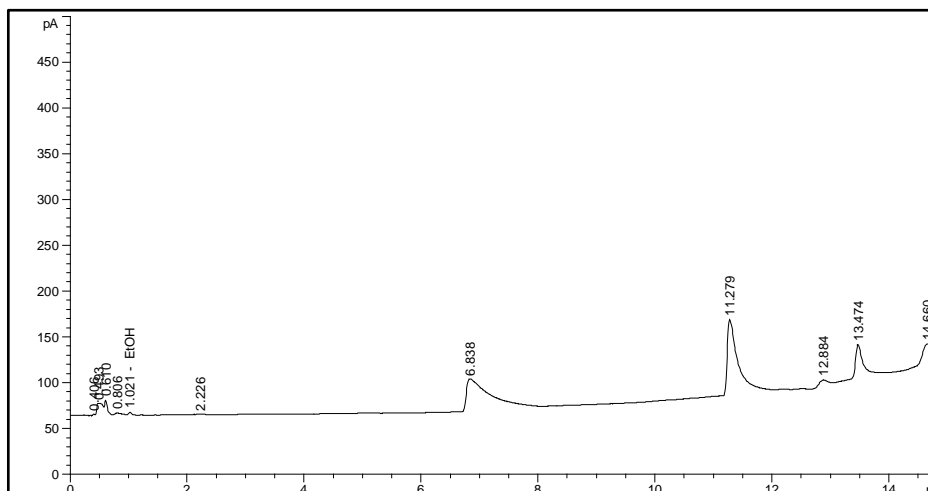
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.020	VV	7.35009	1.46451e-4	1.07643e-3		EtOH
Totals :				1.07643e-3		

### 32. Sampel R.12 (Y<sub>21222</sub>)



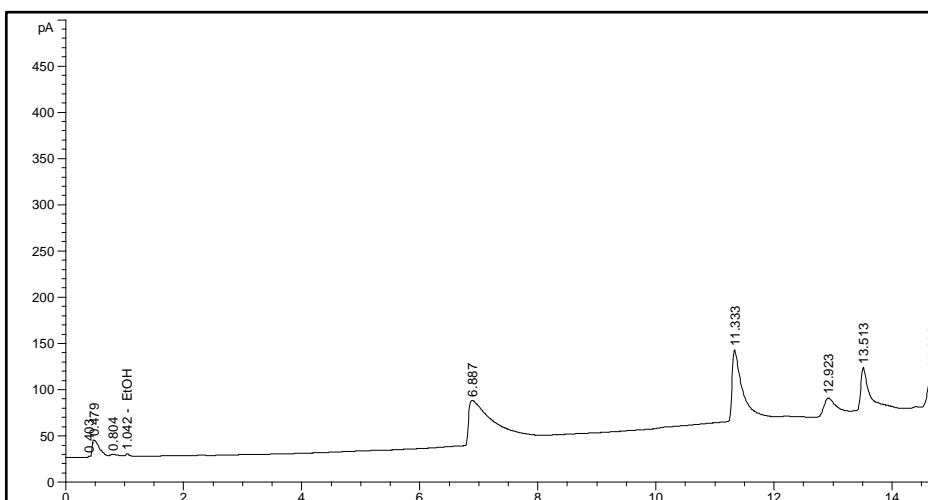
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.031	VV	19.50801	7.65613e-5	1.49356e-3		EtOH
Totals :				1.49356e-3		

### 33. Sampel R.13 (Y<sub>22211</sub>)



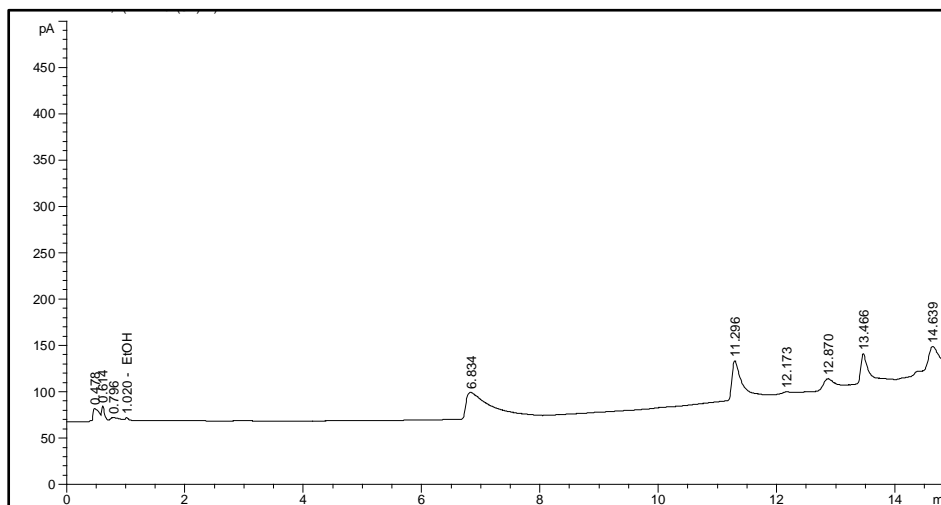
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.021	VV	14.34103	9.17844e-5	1.31628e-3		EtOH
Totals :				1.31628e-3		

### 34. Sampel R.14 (Y<sub>22212</sub>)



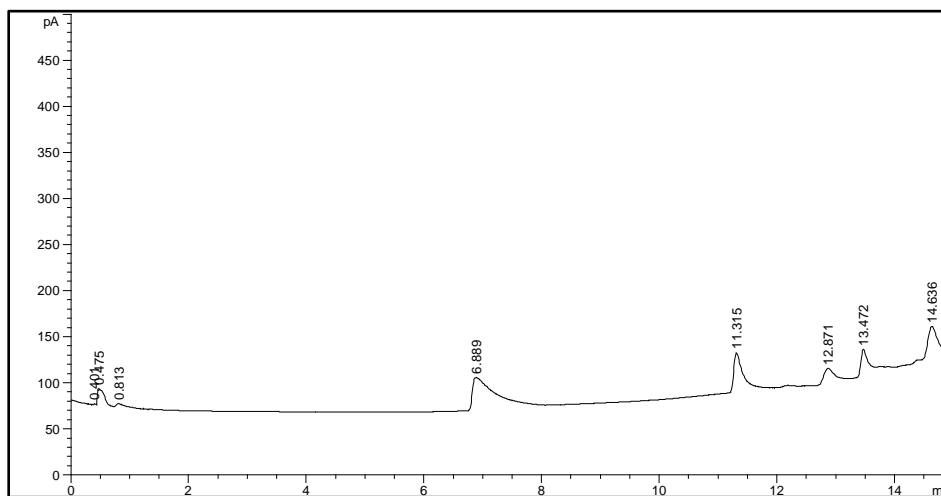
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.042	VV	27.48324	6.43004e-5	1.76718e-3		EtOH
Totals :				1.76718e-3		

### 35. Sampel R.15 (Y<sub>22221</sub>)



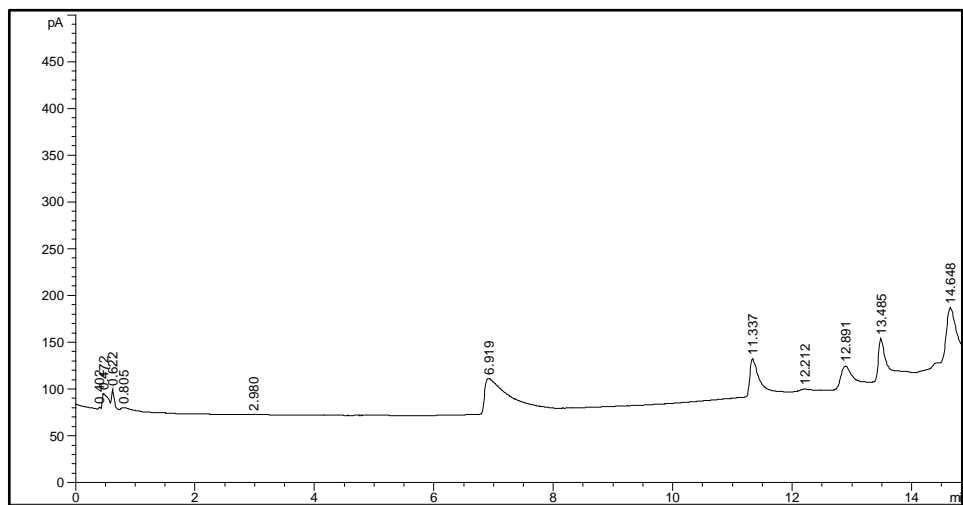
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.020	VV	25.08638	6.71659e-5	1.64484e-3		EtOH
Totals :				1.64484e-3		

### 36. Sampel R.16 (Y<sub>22222</sub>)



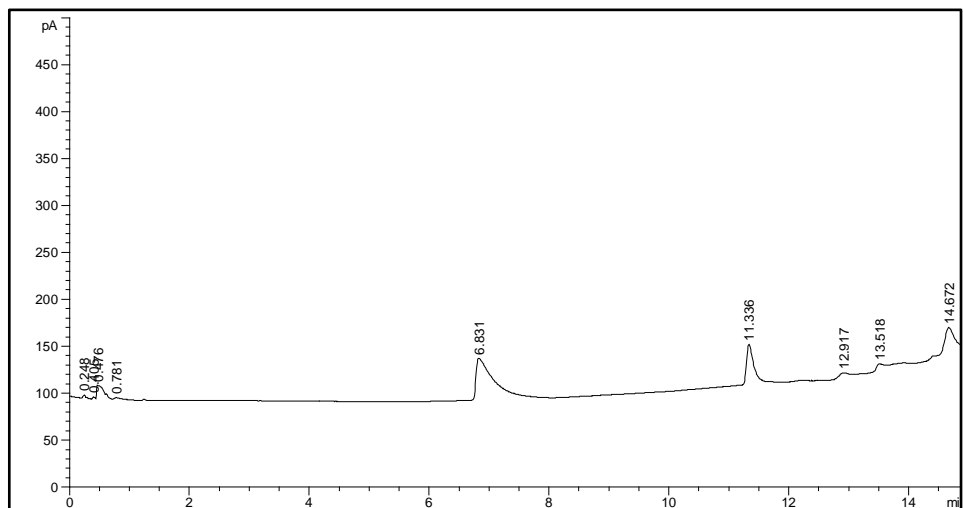
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024		-	-	-		EtOH
Totals :				0.00000		

37. Sampel R.17 (Kontrol 1)



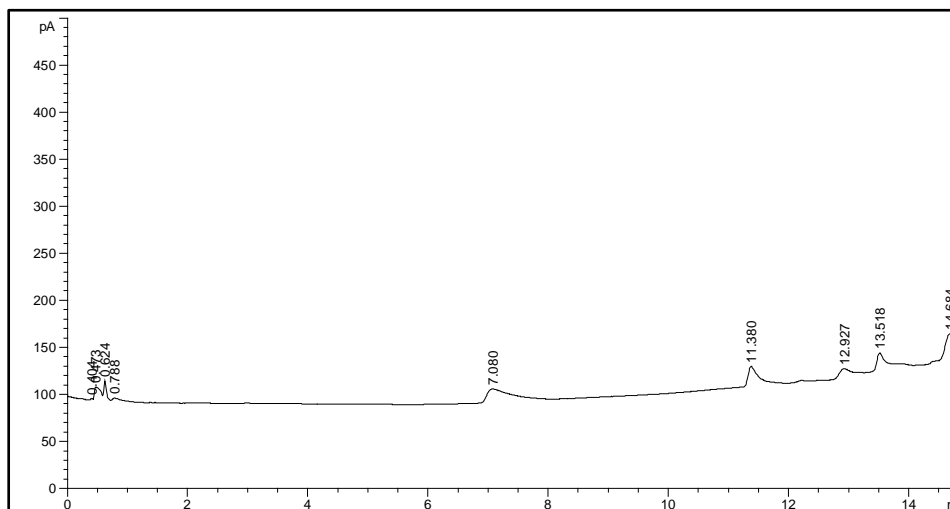
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

38. Sampel R.18 (Kontrol 2)



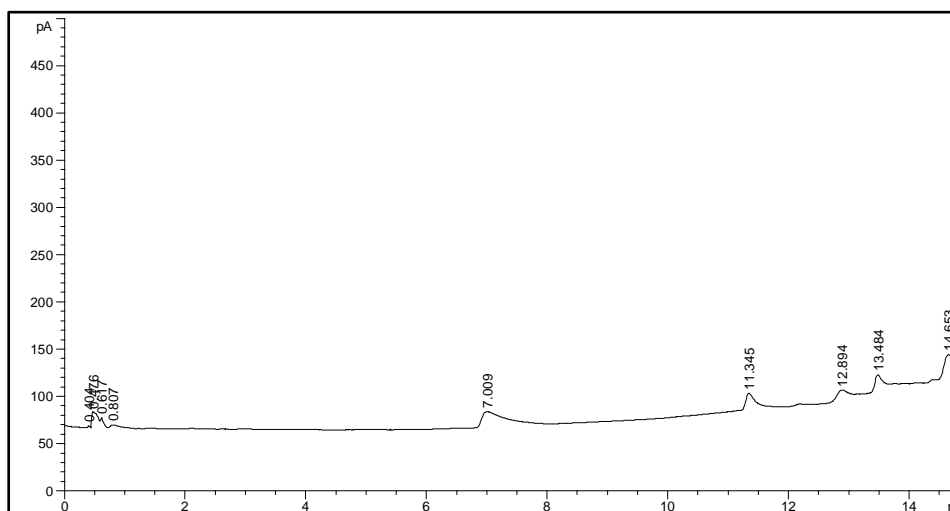
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v) ]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

39. Sampel R.19 (Kontrol 3)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

40. Sampel R.20 (Kontrol 4)



RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.024	-	-	-	-	-	EtOH
Totals :				0.00000		

# KONDISI OPERASI GAS CHROMATOGRAPHY

## Injection Source and Location

Injection Source: Manual

Injection Location: Front

=====

6890 GC METHOD

=====

## OVEN

Initial temp: 150 'C (On)

Maximum temp: 290 'C

Initial time: 8.00 min

Equilibration time: 0.50 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	10.00	220	1.00
2	0.0(Off)		

Post temp: 0 'C

Post time: 0.00 min

Run time: 16.00 min

## FRONT INLET (UNKNOWN)

## BACK INLET ( )

Mode: Split

Initial temp: 275 'C (On)

Pressure: 26.53 psi (On)

Split ratio: 2:1

Split flow: 40.0 mL/min

Total flow: 62.1 mL/min

Gas saver: Off

Gas type: Helium

## COLUMN 1

## COLUMN 2

Capillary Column

(not installed)

Model Number: Agilent 19095P-Q04

HP Plot Q

Max temperature: 280 'C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 530.00 um

Nominal film thickness: 40.00 um

Mode: constant flow

Initial flow: 20.0 mL/min

Nominal init pressure: 26.54 psi

Average velocity: 145 cm/sec

Inlet: Front Inlet

Outlet: Front Detector

Outlet pressure: ambient

## FRONT DETECTOR (FID)

Temperature: 275 'C (On)  
 Hydrogen flow: 40.0 mL/min (On)  
 (Off)  
 Air flow: 400.0 mL/min (On)  
 Mode: Constant makeup flow  
 Makeup flow: 65.0 mL/min (On)  
 Makeup Gas Type: Helium  
 Flame: On  
 Electrometer: On  
 Lit offset: 2.0

## BACK DETECTOR (TCD)

Temperature: 250 'C (Off)  
 Reference flow: 20.0 mL/min  
  
 Mode: Constant makeup flow  
 Makeup flow: 7.0 mL/min (Off)  
 Makeup Gas Type: Helium  
 Filament: Off  
 Negative polarity: Off

## SIGNAL 1

Data rate: 2 Hz  
 Type: front detector  
 Save Data: On  
 Start Save Time: 0.00 min  
 Stop Save Time: 15.00 min  
 Zero: 0.0 (On)  
 Range: 0  
 Fast Peaks: Off  
 Attenuation: 0

## SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz  
 Type: back detector  
 Save Data: Off  
 Zero: 0.0 (Off)  
 Range: 0  
 Fast Peaks: Off  
 Attenuation: 0

## COLUMN COMP 1

Derive from front detector

## COLUMN COMP 2

Derive from front detector

## THERMAL AUX 1

Use: Valve Box Heater  
 Description:  
 Initial temp: 50 'C (Off)  
 Initial time: 0.00 min  
 # Rate Final temp Final time  
 1 0.0(Off)

## POST RUN

Post Time: 0.00 min

## TIME TABLE

Time	Specifier	Parameter & Setpoint
0.00	Signal 1 Attn:	0
0.00	Signal 1:	front detector
0.00	Signal 1 Zero:	On
0.00	Signal 1 Zero:	0.0

=====

Integration Events

=====

Results will be produced with the enhanced integrator.

-----

Default Integration Event Table "Event"



Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	1.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.700	Initial
Initial Shoulders	TAN	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_TCD"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	100.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_ADC"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	20.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_ECD"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	100.000	Initial
Initial Peak Width	0.080	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_NPD"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	500.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial

Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_FPD"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	50.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_uECD"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	500.000	Initial
Initial Peak Width	0.080	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Detector Default Integration Event Table "Event\_FID"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	50.000	Initial
Initial Peak Width	0.040	Initial
Initial Area Reject	1.000	Initial
Initial Height Reject	1.000	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Signal Specific Integration Event Table "Event\_FID1A"

Event	Value	Time
Initial Slope Sensitivity	1.429	Initial
Initial Peak Width	0.090	Initial
Initial Area Reject	2.114	Initial
Initial Height Reject	0.197	Initial
Initial Shoulders	OFF	Initial

Apply Manual Integration Events: Yes

Advanced Baseline : No

Peak Top Type : parabolic interpolation

=====  
Calibration Table  
=====

Default Calibration

Calib. Data Modified : 10/30/2014 9:51:38 AM

Calculate : External Standard Percent  
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 8.000 %  
Abs. Reference Window : 0.000 min  
Rel. Non-ref. Window : 5.000 %  
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min  
Uncalibrated Peaks : not reported  
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated  
Correct All Ret. Times: Yes, even for non-identified peaks

Curve Type : Linear  
Origin : Included  
Weight : Equal

Recalibration Settings:  
Average Response : Average all calibrations  
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:  
Calibration Table after Recalibration  
Normal Report after Recalibration  
If the sequence is done with bracketing:  
Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: FID1 A,

RetTime	Lvl	Amount	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
[min]	Sig	[%(v/v)]			
1.024	1	3	1.00000e-4	2.79679	3.57552e-5
		4	1.00000e-3	22.74994	4.39562e-5
		1	1.00000e-2	309.53375	3.23067e-5
		6	2.50000e-2	601.37738	4.15712e-5
		5	5.00000e-2	1387.50000	3.60360e-5
		7	7.50000e-2	2150.41577	3.48770e-5
		2	1.00000e-1	2943.61499	3.39718e-5

=====  
Peak Sum Table  
=====

\*\*\*No Entries in table\*\*\*  
=====

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiprabowo, D., S., Isnanto, R., R. (2011). *Pendeteksi Kadar Alkohol Jenis Etanol Pada Cairan Dengan Menggunakan Mikrokontroler Atmega85352*. Artikel Ilmiah Teknik Elektro, Universitas Diponegoro.
- Al-Judaibi A., A. (2011). *Effect of Some Fermentation Parameters on Ethanol Production from Beet Molasses by Saccharomyces cerevisiae CAIM13*. American Jurnal of Agricultural an Biological Sciences 6 : 301-306
- Arantes, V., dan Saddler J.N. (2011). *Cellulose Accessibility Limits The Effectiveness of Minimum Cellulase Loading on The Efficient Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Substrates*. Biotechnology for Biofuel 4.
- Arora D.S., Gill, P. K. (2005). *Production of Ligninolytic Enzymes by Phlebia Floridensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 1021-1028.
- Assadad, L., Utomo, B. S. B., Sari, R. N. (2010). *Pemanfaatan Mikroalga Sebagai Bahan Baku Bioetanol*. Squalen 5 : 51-58.
- Astuti, N. (2013). *Potensi Eceng Gondok (Eichhornia crassipes (Mart.) Solms) Rawapening Untuk Biogas Dengan Variasi Campuran Kotoran Sapi*. Tesis, Program Studi Magister Ilmu Lingkungan Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
- Aswathy, U. S., Sukumaran R. K., G. Devi L., Rajasree K. P., Singhanian R. R., Pandey A. (2010). *Bio-Ethanol From Water Hyacinth Biomass: An Evaluation Of Enzymatic Saccharification Strategy*. Bioresource Technology 101 : 925–930.
- Awasthi, M., Kaur, J., Rana, S. (2008). *Bioethanol Production Through Water Hyacinth, Eichhornia Crassipes Via Optimazation of The Pretreatment Condition*. Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering 3 : 42-46.
- Axelsson, J. (2011). *Separate Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Spruce*. Tesis, Performed at SEKAB E-Technology Örnköldsvik, Sweden.
- Chandel, A.K., Chandrasekhar G., Radhika K., Ravinder R., dan Ravindra P. (2011). *Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions*. Biotechnology and Molecular Biology Review 6 : 008 – 020.
- Elevri, P., A., Putra, S., R.(2006). *Produksi Etanol Menggunakan Saccharomyces Cerevisiae Yang Diamobilisasi Dengan Agar Batang*. Akta Kimindo 1: 105-114.
- Esthiaghi, M. N., Yoswathana, N., Kuldiloke, J., Ebadi, A. G. (2012). *Preliminary Study For Bioconversion of Water Hyacinth (Eichornia Crassipes) to Bioethanol*. African Journal of Biotechnology 11: 4921-4928.

- Fackler, J. (2004). *Water Hyacinth Fact Sheet*. Forestry and Natural Resources. 2004.
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan*. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.
- Febriani, E. A. (2014). *Pretreatment Eceng Gondok Sebagai Bahan Baku Bioetanol dengan Phanaerochaete Chrysosporium dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*. Tugas Akhir, Program Studi Teknik Lingkungan, Surabaya.
- Gerbono, A. dan Siregar, A.. (2005). *Kerajinan Eceng Gondok*. Kanisius, Yogyakarta.
- Gozan, M. 2014. *Teknologi Bioetanol Generasi-Kedua*. Erlangga : Jakarta.
- Gupta, R., Sharma, K. K., Kuhad, R. C. (2009). *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) of Prosopis Juliflora, a Woody Substrate, for The Production of Cellulosic Ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis-NCIM 3498*. Biosource Technology 100 : 1214-1220.
- Handayani, A., G. dan Pandebesie, E., S. (2014). *Hidrolisis Eichhornia crassipes Menggunakan Proses Fisika, Kimia, dan Biologis*. Prosiding Seminar Nasional Waste Management II.
- Harun, M.Y., Dayang A.B. (2011). *Effect of Physical Pretreatment on Dilute Acid Hydrolysis of Water Hyacinth (Eicchornia crassipes)*. Bioresource Technology 102 : 5193-5199.
- Hattaka, A. (2001). *Biodegradation of Lignin*. Biopolymers 1: 129-180
- Huang, R., Su, R., Qi, W., dan He, Z. (2011). *Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research*. Bioenergy Res 4 : 225 – 245.
- Idres, M., Adnan, A., Sheikh, S., Qureshi, F. M. (2012). *Optimazation of Dilute Acid Pretreatment of Water Hyacinth Biomass for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Production*. EXCLI Journal 12 : 30-40.
- Irvani, M., H. (2008). *Simulasi Komputer untuk Menentukan Kombinasi Perlakuan dengan Disain Faktorial Setengah Replikasi*. STIMIK MDP Palembang.
- Joshi, B., Bhatt, M. R., Sharma, D., Joshi, J., Malla, R., Sreerama, L. (2011). *Lignocellulosic Ethanol Production: Current Practices and Recent Developments*. Biotechnology and Molecular Biology Review 6: 172-182.
- Juairiah, S., Susilowati, A., Setyaningsih, R. (2004). *Ethanol Fermentation From Solid Waste of Tapioca (Onggok) by Aspergillus niger and Zymomonas mobilis*. Bioteknologi 1: 7-12.
- Kodri, Argo, B. D., Yulianingsih, R. (2013). *Pemanfaatan Enzim Selulase dari Trichoderma Reesei dan Aspergillus Niger sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave*. Jurnal Bioproses Komoditas Tropis 1 : 36-43.
- Kubicek, C.P. (2013). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Kusumaningati, M., A., Nurhatika, S., Muhibuddin, A. (2013). *Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri Zymomonas mobilis dan Lama Fermentasi Pada Produksi Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya*. Jurnal Sains dan Seni POMITS 2: 2337-3520.
- Lasser, Schulman, M., Allen, D., Lichwa, S.G., Antal, M.J., Lynd, L.R. (2002). *A Comparsion of Liquid hot Water dan Steam Pre-Treatments of Sugar Cane Bagas for Bioconversion to Etanol*. Journal Technology 82: 33-34.
- Merina, F., Trihadiningrum, Y. (2011). *Produksi Bioetanol dari Eceng Gondok (Eichornia crassipes) dengan Zymomonas mobilis dan Saccharomyces cerevisiae*. Prosiding Seminar Nasional Manajemen Teknologi XIII, 2011, Surabaya.
- Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. (2008). *Ethanol Production from Candidate Energy Crops: Water Hyacinth (Eichhornia crassipes) and Water Lettuce (Pistia stratiotes L)*. Biosources Technology 99: 2495-2500.
- Muslihah, S., Heremurti, W. (2011). *Pengaruh pH dan Konsetrasi Zymomonas Mobilis untuk Produksi Etanol rari Sampah Buah Jeruk*. Prosiding Skripsi Semester genap. Jurusan Teknik Lingkungan ITS Surabaya.
- Narayan, R. H., Sathvik, V., Kamala, K., Shivashankar, B. J., Patil, J. H. 2013. *Determination of Optimum Period of Saccharification of Water Hyacinth using Trichoderma ressei and Aspergillus niger*. Journal of Chemical Sciences 3 : 49-52.
- Neves, Kimura, T., Shimizu, N., Nakajima, M. (2007). *State of The Art and Future Trends of Bioethanol Production*. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology. 1: 1 – 14.
- Nigam, J. N. (2002). *Bioconversion of Water Hyacinth (Eichhornia Crassipes) Hemicellulose Acid Hydrolysate to Motor Fuel Ethanol by Xylose-Fermenting Yeast*. Journal of Biotechnology 97:107-116.
- Novembrianto, R. (2014). *Penentuan Laju Reaksi Pembentukan Gula Reduksi Pada Hidrolisis Selulosa Eceng Gondok oleh Jamur dan Bakteri Selulolitik*. Tesis, Program Studi MMT ITS, Surabaya.
- Novembrianto, R. Pandebesie, E., S. (2014). *Laju Biokonversi Eceng Gondok (Eichhornia crassipes) pada Proses Hidrolisis oleh Jamur Selulolitik*. Seminar Nasional Pascasarjana XIV, ITS Surabaya pada tanggal 8 Agustus 2014.
- Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., Zacchi, G. (2007). *A Comparison Between Simultaneous Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation Using Steam-Pretreated Corn Stover*. Process Biochemistry 42: 834–839.
- Rafsanjani, K. A., Sarwono, Noriyanti, R. D. (2012). *Studi Pemanfaatan Potensi Biomass dari Sampah Organik Sebagai Bahan Bakar Alternatif (Briket)*

*dalam Mendukung Program Eco-Campus di ITS surabaya. Jurnal Teknik POMITS 1 : 1-6.*

- Ramos, J., Rojas, T. (2004). *Enzymatic and Fungal Treatments on Sugarcane Bagas for The Production Mechanical Pulp. Food Chemical: 5057-5062.*
- Ratnani, R., D., Hartati, I., Kurniasari, L. (2011). *Pemanfaatan Ecen Gondok (Eichornia Crassipes) Untuk Menurunkan Kandungan COD (Chemical Oxygen Demond), pH, Bau, dan Warna Pada Limbah Cair Tahu. Momentum 7: 41 – 47.*
- Safaria, S., Idiawati N., Zaharah T. A. (2013). *Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari Aspergillus niger dan Trichoderma reesei dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura.*
- Sagar, Ch., Kumari, N. A. (2013). *Sustainable Biofuel Production from Water Hyacinth (Eicchornia Crassipes). International Journal of Engeenering Trends and Technology 4 : 4454-4458.*
- Sambusiti dan Cecilia. (2012). *Physical, Chemical and Biological Pretreatments to Enhance Biogas Production from Lignocellulosic Substrates. Disertasi, Environmental Engineering, Politecnico Di Milano.*
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A. (2007). *Pemanfaatan Sellulosa Bagas untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Dengan Enzim Xylanase. MAKARA, Teknologi 11: 17-24.*
- Sanito, R. C. (2014). *Penentuan Kinetika Reaksi dan Gula Reduksi Eceng Gondok Menggunakan Kombinasi Hidrolisis Asam dan Biologis. Tesis, Program Studi MMT ITS, Surabaya.*
- Sapariantin, E., Purwoko, T., Styaningsih, R. (2006). *Ethanol Fermentation From Cashew Juice (Anacardium occidentale) By Zymomonas mobilis Using Urea. Bioteknologi 3: 50-55.*
- Sittadewi, E. H. (2007). *Pengolahan Bahan Organik Eceng Gondok Menjadi Media Tumbuh untuk Mendukung Pertanian Organik. Jurnal Teknik Lingkungan 8 : 229-234.*
- Soeprijanto. (2008). *Biokonversi Selulose dari Limbah Tongkol Jagung Menjadi Glukosa Menggunakan Jamur Aspergillus Niger. Jurnal Purifikasi 9.*
- Soeprobowati, T. R. (2012). *Mitigasi Danau Eutrofik: Studi Kasus Danau Rawapening. Prosiding Seminar Nasional Limnologi VI, 2012 : 36-48.*
- Taherzadeh, M.J, dan Karimi, K. (2008). *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci 9: 1621 – 1651.*
- Widjaja, T., Natalia, H., Darmawan R., Setyo, G. (2010). *Teknologi Immobilisasi Sel Ca-Alginat untuk Memproduksi Etanol Secara Fermentasi Kontinyu dengan Zymomonas mobilis Termutasi. Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses :1411-4216.*

- Wignyanto, Suharjono, Novita. (2001). *Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum Saccharomyces cerevisiae pada Fermentasi Etanol*. Jurnal Teknologi Pertanian 2: 66-77.
- Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D., Sheehan, J. (1999). *Process Design and Costing of Bioethanol Technology: a Tool for Determining The Status and Direction of Research and Development*. Biotechnology: 794-803.
- Wyman, C.E. (1994). *Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities*". Bioresource Technology 50 : 3 – 16.
- Yonathan, A., Prasetya, A. R., Pramudono, B. (2013). *Produksi Biogas dari Eceng Gondok (Eichornia crassipes): Kajian Konsistensi dan pH Terhadap Biogas Dihasilkan*. Jurnal Teknologi Kimia dan Industri 2: 211-215.
- Zhu, J. (2011). *The Role of Cellulose Accessibility on Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses*. International Congress on Energy 2011. AIChE Annual Meeting.



***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***

## Biografi Penulis



Nadia Amanah dilahirkan di Kota Banjarmasin pada tanggal 23 Maret 1990 bertepatan dengan tanggal 25 Sya'ban 1410 H. Pada tahun 1994 putri pertama dari bapak Drs. Abdurrahman, M dan Ibu Nurul Maulida ini memulai sekolah di TK Adhiyaksa XIV Kota Banjarmasin. Selepas TK penulis melanjutkan sekolah dasar di Madrasah Diniyyah Islamiyyah Muhammadiyah Sei Kindaung 1-2 Banjarmasin pada tahun 1996, SMPN 24 Banjarmasin pada tahun 2002, kemudian pada tahun 2005 melanjutkan bersekolah di Madrasah Aliyah Negeri 1 Banjarmasin. Penulis memasuki jenjang S-1 Jurusan Teknik Lingkungan Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin pada tahun 2008 melalui jalur Seleksi Masuk Unlam Terpadu (SMUT). Selepas menyelesaikan Program Sarjana Penulis memasuki program S-2 Jurusan Teknik Lingkungan ITS Surabaya pada tahun 2013. Penulis dapat dihubungi di nomor 087886074134, e-mail [nadia.amanah@ymail.com](mailto:nadia.amanah@ymail.com). Akun Facebook "Nadia Nur Rahman". Alamat Rumah di Jl. Karya Sabumi VII RT. 17 No. 46<sup>A</sup> Banjarmasin Utara, Kalimantan Selatan, 70124.

*"Ilmu itu lebih baik daripada harta. Ilmu menjaga engkau dan engkau menjaga harta. Ilmu itu penghukum (hakim) dan harta terhukum. Harta itu kurang apabila dibelanjakan tapi ilmu bertambah bila dibelanjakan."*

*-Khalifah Ali bin Abi Thalib-*